

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
10. Januar 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/02775 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/52,  
9/64, C12Q 1/68, C07K 16/40, A61K 38/43, G01N 33/68,  
33/577

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07457

(22) Internationales Anmeldedatum:  
29. Juni 2001 (29.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 31 932.7 30. Juni 2000 (30.06.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BOEHM, Thomas [DE/DE]; Freiburgerstrasse 30, 79279 Vörstetten (DE). DEAR, Neil, T. [AU/DE]; Komturstasse 17, 79106 Freiburg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach & Partner, Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(54) Title: CALPAIN PROTEASE 12

(54) Bezeichnung: CALPAIN-PROTEASE 12

(57) Abstract: The invention relates to calpain protease 12 (Capn12), which is characterized in that it has an amino acid sequence comprising amino acids 1 - 342 of SEQ ID NO: 1 or an amino acid sequence selected amongst SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4. The invention also relates to the functional analogs of said calpain protease 12, to the nucleic acids coding therefor, to recombinant vectors containing said coding sequences and to microorganisms transfected therewith. The invention further relates to a method for recombinant production of Capn12 and to different applications of Capn12 and the nucleic acids coding therefor.

(57) Zusammenfassung: Calpain-Protease 12 (Capn12), dadurch gekennzeichnet, daß die eine Aminosäuresequenz, umfassend die Aminosäuren 1 - 342 der SEQ ID NO: 1 oder eine Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 aufweist; sowie deren funktionale Analoge; dafür kodierende Nukleinsäuren; rekombinante Vektoren, welche diese kodierenden Sequenzen enthalten; damit transfizierte Mikroorganismen; Verfahren zur rekombinanten Herstellung der Capn12; und verschiedene Anwendungen der Capn12 und dafür kodierender Nukleinsäuren.

WO 02/02775 A2

BEST AVAILABLE COPY

## Calpain-Protease 12

## 5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine neue Calpain-Protease mit der Bezeichnung Calpain-Protease 12 und funktionale Analoge davon (im Folgenden bezeichnet als Capn12); dafür kodierende Nukleinsäuren; rekombinante Vektoren, welche diese kodierenden Sequenzen enthalten; damit transfizierte Mikroorganismen; Verfahren zur rekombinanten Herstellung der Capn12; sowie verschiedene Anwendungen der Capn12 und dafür kodierender Nukleinsäuren.

15 Calpaine sind eine Familie cytosolischer Cystein-Proteasen. Die klassischen Calpaine bestehen aus einer isoformspezifischen großen Untereinheit (80 kDa) und einer unveränderlichen kleinen Untereinheit (30 kDa), die Capn4 genannt wird. Die große Untereinheit klassischer Calpaine weist eine Vier-Domänen-Struktur auf, umfassend eine Domäne mit Proteaseaktivität und eine C-terminale, Calmodulin-ähnliche Domäne, die Calcium binden kann. Man fand jedoch kürzlich mehrere atypische Säugetierhomologe der großen Calpain-Untereinheit, denen die Kennzeichen eines aktiven Zentrums einer Protease fehlten (Capn6; Dear et al., 1997) und/oder die 25 eine alternative C-terminale Domäne aufweisen, die möglicherweise kein Calcium bindet (Capn5, Capn6, Capn7, Capn8; Dear et al., 1997; Braun et al., 1999; Franz et al., 1999). Eine Zusammenfassung der gegenwärtig bekannten Mitglieder der Genfamilie der Säugetier-Calpaine ist im Internet erhältlich (<http://Ag.Arizona.Edu/calpains>). 30

Die physiologische Rolle der Calpaine ist unklar. Calpaine spalten zahlreiche Substrate (Carafoli und Molinari, 1998) und wurden mit einer Vielzahl von Prozessen in Zusammenhang gebracht, einschließlich Apoptose (Wang, 2000), Zellteilung (Mellgren, 1997), 35 Modulation der Interaktionen des Integrin-Cytoskeletts (Schoenwelder et al., 1997) und synaptische Plastizität (Chan und Mattson, 1999). Sie wurden außerdem mit zahlreichen pathologischen Krankheitszuständen in Verbindung gebracht, wie Alzheimer, Katarakt, Demyelinisierung, kardiale Ischämie, Entzündung und traumatische Hirnverletzung (Übersichtsartikel: Carafoli und Molinari, 40 1998; Sorimachi et al., 1997; Wang und Yuen, 1997). Mutationen im Capn3-Gen sind für die Beckengürtel-Muskeldystrophie Typ 2A verantwortlich (Richard et al., 1995). 45

Aufgrund der vielfältigen physiologischen und pathologischen Funktionen der Calpaine, stellte sich die Aufgabe, neue Homologe der Gen-Familie der großen Calpain-Untereinheit bereitzustellen. Damit ließen sich beispielsweise neue Wirkstoffe bzw. neue Wirkstofftargets finden oder entwickeln, die bei der Diagnose, Therapie und/oder Prophylaxe von Krankheitszuständen einsetzbar sind, in die Calpaine und deren Substrate oder auf diese wirkende Stoffe involviert sind. Diese Aufgabe wurde überraschenderweise durch die Bereitstellung einer neuen Calpain-Protease, der Calpain-Protease 12 (Capn12) und funktionalen Äquivalenten davon, gelöst.

Die Capn12 ist dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aminosäuresequenz, umfassend die Aminosäuren 1 - 342 der SEQ ID NO: 1 aufweist. Gegenstand der Erfindung sind auch funktionale Äquivalente dieser Teilsequenz.

Bevorzugte Varianten davon sind dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 aufweisen. SEQ ID NO: 1 steht für die Aminosäuresequenz der Splice-Variante Capn12A, SEQ ID NO: 2 für die Aminosäuresequenz der Splice-Variante Capn12B, SEQ ID NO: 3 für die Aminosäuresequenz der Splice-Variante Capn12C und SEQ ID NO: 4 für die Aminosäuresequenz der Capn12 aus Klon 914413 der Maus-EST-Datenbank. Dabei sind die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 1 bis 4 im N-terminalen Abschnitt der Aminosäuren 1 - 342 zueinander identisch. Das vorhergesagte Protein entsprechend der Splice-Variante Capn12A weist 720 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 80,5 kDa auf.

Gegenstand der Erfindung sind auch die funktionalen Äquivalente der Capn12 bzw. der konkret offenbarten Aminosäuresequenzen. Funktionale Äquivalente umfassen Aminosäuresequenzen, die sich von den konkreten Sequenzen ableiten lassen und in denen im Vergleich dazu eine oder mehrere Aminosäuren substituiert, deletiert, invertiert oder addiert sind, ohne dass die Cystein-Protease-Aktivität und/oder wenigstens ein weiteres Charakteristikum der Capn12 im Wesentlichen beeinflusst werden. Weitere Capn12-Charakteristika werden in späteren Abschnitten beschrieben. Erfindungsgemäß umfasst sind auch Capn12-charakteristische Teilsequenzen oder Fragmente der Capn12, die beispielsweise durch proteolytischen Verdau, Peptidsynthese oder rekombinante DNA-Technik hergestellt werden können. Diese können beispielsweise zur Herstellung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper verwendet werden.

Die konkret offenbarten Aminosäuresequenzen repräsentieren Amino-

säuresequenzen von Splice-Varianten der Capn12, die aus einer Maus-EST-Datenbank bestimmt wurden. Gegenstand der Erfindung sind jedoch auch alle Capn12-Homologe eukaryontischer Spezies, d.h. der Evertebraten und Vertebraten, insbesondere der Säugetiere, z.B. Ratte, Katze, Hund, Schwein, Schaf, Rind, Pferd, Affe und besonders bevorzugt Mensch und weitere natürlich vorkommende Varianten. Erfindungsgemäß umfasst sind auch alle entwicklungs- und organ- bzw. gewebespezifisch exprimierte Capn12-Formen und künstlich erzeugte Homologe, die die vorgegebenen strukturellen und/oder funktionalen Eigenschaften aufweisen.

Die erfindungsgemäße Capn12 ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass sie Cystein-Protease-Aktivität aufweist. Sie weist in ihrer Aminosäuresequenz die Aminosäuren Cys, His und Asn auf (in den Splice-Varianten Capn12A, B und C: Cys105, His259 und Asn283), die für das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen charakteristisch und für dessen Funktion wesentlich sind. Die Splice-Variante Capn12A weist darüber hinaus eine ausgeprägt saure Region und eine Calmodulin-ähnliche, vermutlich  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Region auf.

Die erfindungsgemäße Capn12 ist außerdem dadurch gekennzeichnet, dass das sie kodierende Gen der Maus auf dem Chromosom 7 zwischen den Markern D7Mit72 (10,4 cM) und D7Mit267 (11,0 cM) lokalisiert ist.

Die erfindungsgemäße Capn12 ist außerdem dadurch gekennzeichnet, dass sie, z.B. in der Maus, im Cortex des Haarfollikels der Haut exprimiert wird.

30

Weiterhin ist die erfindungsgemäße Capn12 dadurch gekennzeichnet, dass sie in der Anagenphase des Haarzyklus exprimiert wird.

Gegenstand der Erfindung sind auch Calpain-Proteine, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie wenigstens eine erfindungsgemäße Capn12 aufweisen. Vorzugsweise weist ein solches Calpain-Protein neben der Capn12 als große Untereinheit noch eine Capn4 als kleine Protein-Untereinheit auf. Darüber hinaus können noch weitere Protein-Untereinheiten, wie beispielsweise regulatorische Untereinheiten oder Untereinheiten, die die Lokalisation des Proteins in definierten Zellkompartimenten vermitteln, enthalten sein.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Polynukleotide, die für eine erfindungsgemäße Capn12 kodieren, sowie deren funktionale Äquivalente und damit hybridisierbare oder dazu komplementäre Polynukleotide, umfassend einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Se-

quenzen. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Bibliotheken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

10

Gegenstand der Erfindung sind auch Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt unter SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 8. SEQ ID NO: 5 steht für die Nukleinsäuresequenz der cDNA der Splice-Variante Capn12A, SEQ ID NO: 6 für die Nukleinsäuresequenz der cDNA der Capn12B, SEQ ID NO: 7 für die Nukleinsäuresequenz der cDNA der Capn12C und SEQ ID NO: 8 für die genomische Nukleinsäuresequenz der Capn12 der Maus, umfassend alle Exon- und Intron-Sequenzen. Die vorhergesagte genomische Sequenz der Capn12 der Maus umfasst 21 Exons und einen genomischen Abschnitt von 13116 Basenpaaren.

Funktionale Äquivalente erfindungsgemäßer Polynukleotide umfassen durch Degeneration des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen und damit stumme Nukleotidsubstitutionen (d.h. ohne Veränderungen der resultierenden Aminosäuresequenz) und konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt). Funktionale Äquivalente erfindungsgemäßer Polynukleotide weisen somit eine durch Nukleotidsubstitution, -deletion, -inversion oder -addition veränderte Sequenz auf, kodieren jedoch ebenfalls für eine funktional äquivalente Capn12, wie z.B. mit gleicher oder vergleichbarer Cystein-Protease-Aktivität. Insbesondere umfassen erfindungsgemäß geeignete Polynukleotide wenigstens eine der Teilsequenzen, welche für charakteristische Aminosäuresequenzen der Capn12 kodieren.

Gegenstand der Erfindung sind auch die Primersequenzen SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 und SEQ ID NO: 18, die an erfindungsgemäße Polynukleotide hybridisieren können bzw. komplementär dazu sind und beispielsweise zu deren Amplifikation durch RT-PCR oder PCR eingesetzt werden können.

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide hybridisieren zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen

zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu müssen die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 80-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50 - 70°C, vorzugsweise 60 - 65°C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden.

15 Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, die wenigstens ein erfindungsgemäßes Polynukleotid umfassen, das mit wenigstens einer regulatorischen Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft ist. Vorzugsweise liegt 5'-strangaufwärts vom erfindungsgemäßen Polynukleotid eine Promotorsequenz und ermöglicht auf diese Weise eine kontrollierte Expression der Capn12. Besonders bevorzugt liegen 3'-strangabwärts vom erfindungsgemäßen Polynukleotid eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulatorische Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der die Capn12 kodierenden Sequenz.

Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung regulatorischer und kodierender Sequenzen, wie z.B. von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulatorischer Elemente derart, sodass jedes der regulatorischen Elemente seine Funktion vor, während oder nach Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für weitere operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen, Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Brauchbare regulatorische Elemente umfassen auch selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Die Expressionskassette kann aber auch einfacher aufgebaut sein, d.h. es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen kann beispielsweise die natürliche Regulati-

onssequen- so mutiert werden, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette enthalten sein.

5

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -PR- oder im  $\lambda$ -PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P<sub>r</sub>P<sub>1</sub>-Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

20

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert oder überexprimiert wird. Die Expression kann durch diese regulatorischen Elemente auch gewebe-, zell- oder entwicklungsspezifisch erfolgen, wenn der Vektor in einen höheren Organismus, wie in ein Tier oder eine Pflanze, eingebracht wird.

30

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA erhöht wird. Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Expression bewirken.

Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einem geeigneten die Capn12 kodierenden Polynukleotid, sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie beispielsweise die Insertion über Restriktionsenzymchnittstellen, oder wie sie bei-

spielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989), sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

- Gegenstand der Erfindung sind auch rekombinante Vektoren zur
- 10 Transformation von eukaryontischen oder prokaryontischen Wirten, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette tragen. Diese Vektoren erlauben die Expression der Capn12 in einem geeigneten Wirtsorganismus. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus
- 15 "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind neben Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Plasmide, Cosmide, und
- 20 lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus oder chromosomal repliziert werden.

- Gegenstand der Erfindung sind auch Mikroorganismen, die einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten oder solche, die die Capn12 en-
- 25 dogen exprimieren. Diese können zur Produktion rekombinanter Capn12 eingesetzt werden. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten als Teil eines Expressionsvektors in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fach-
- 30 mann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispiels-
- 35 weise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997 und in J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY (1980), beschrieben.

40

- Als Wirtsorganismen zur Transformation mit erfindungsgemäßen Vektoren sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Polynukleotide, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter
- 45 Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie



z.B. *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, eukaryotische Mikroorganismen, insbesondere Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryontische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen. Ge-  
5 wünschensfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out-Tiere oder -Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende en-  
10 dogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z.B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expres-  
15 sionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbbegebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor trans-  
20 formierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie  
25 genutzt werden.

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die  
30 Phagen  $\lambda$ ,  $\mu$  oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geei-  
35 gnet sind, zu verstehen.

Wie oben beschrieben, kann das Genprodukt vorteilhaft auch in transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie  
40 Translationssysteme mit der von der Nukleinsäure abgeleiteten RNA zu programmieren.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Capn12, wobei man einen Capn12-produzie-  
45 renden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Capn12 induziert und die Capn12 aus der Kultur isoliert. Die

Capn12 kann so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

Der Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und  
 5 fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual,  
 10 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

Die Zellen werden dann, falls Capn12 nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen und die Capn12 nach bekannten  
 15 Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.  
 Eine Aufreinigung der Capn12 kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen  
 25 üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg,  
 30 berg, Berlin beschrieben.

Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für  
 35 veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press).  
 Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer  
 45 Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Capn12 oder eines erfindungsgemäßen Calpain-Proteins als Cystein-Protease. Bevorzugt ist die Verwendung in Verbindung mit natürlichen Substraten der Capn12, es können jedoch alle Substrate verwendet werden, die an das aktive Zentrum der Capn12 binden und dort gespalten werden. Die Capn12 kann so beispielsweise als Cystein-Protease in molekularbiologischen und chemischen Verfahren eingesetzt werden.

Gegenstand der Erfindung sind darüber hinaus pharmazeutische Mittel, die eine erfindungsgemäße Capn12, ein erfindungsgemäßes Calpain-Protein oder einen erfindungsgemäßen rekombinanten Vektor, sowie wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein Verdünnungsmittel enthalten. Die erfindungsgemäße Capn12, das erfindungsgemäße Calpain-Protein oder der Vektor können als solche, vorzugsweise jedoch zusammen mit einem Träger oder Verdünnungsmittel verabreicht werden. Dieser Träger kann abhängig von der gewünschten Dosierungsform in fester oder flüssiger Form vorliegen. Geeignete pharmazeutische Mittel können außerdem neben einer erfindungsgemäßen Capn12, einem erfindungsgemäßen Calpain-Protein oder einem erfindungsgemäßen rekombinanten Vektor gewünschtenfalls noch weitere pharmazeutische Wirkstoffe im Gemisch oder getrennt in einem Kombinationspräparat enthalten. Beispielsweise können solche Wirkstoffe die Wirkung der enthaltenen Capn12, des Calpain-Proteins oder des Vektors verstärken, einen anderen Wirkmechanismus aufweisen und damit additiv wirken oder die Gesamtkonstitution des Patienten verbessern.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung einer erfindungsgemäßen Capn12, eines erfindungsgemäßen Calpain-Proteins oder eines erfindungsgemäßen Vektors zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die in Zusammenhang mit einer unzureichenden Expression der Capn12 stehen. Dabei umfasst eine erfindungsgemäße Behandlung die Verhinderung der Ausbildung der Erkrankung bei einem Patienten mit einer entsprechenden Prädisposition oder die Therapie einer bereits bestehenden Erkrankung durch verlangsamtes Fortschreiten oder sogar durch Verbesserung des Zustandes des Patienten, möglicherweise bis zum völligen Ausheilen.

- In Situationen, in denen ein Mangel an Capn12 herrscht, können mehrere Verfahren zur Substituierung eingesetzt werden. Zum einen kann in einem erfindungsgemäßen Medikament eine Capn12 oder ein erfindungsgemäßes Calpain-Protein direkt oder gentherapeutisch in Form ihrer kodierenden Nukleinsäuren (DNA oder RNA) appliziert werden. Zur gentherapeutischen Anwendung können beliebige Vehikel, beispielsweise sowohl virale (retrovirale Transfektion), als auch nicht-virale Vehikel (z.B. Liposomen-Transfektion) zum Einsatz kommen. Geeignete Vehikel können über geeignete Rezeptormoleküle oder dergleichen spezifisch an genau definierte Zielzellen binden und diese gezielt transformieren. Die Transfektion kann im Körper des Patienten erfolgen oder es werden entnommene Zellen in-vitro transfektiert und nachfolgend wieder dem Patienten appliziert. Geeignete Verfahren werden beispielsweise von Strauss und Barranger in Concepts in Gene Therapy (1997), Walter de Gruyter, Hrsg., beschrieben. Ein weiteres Verfahren zur Capn12-Substitution stellt die Stimulation des endogenen, körpereigenen Gens dar. Auch der turn-over oder die Inaktivierung erfindungsgemäßer Capn12, z.B. durch Proteasen, können blockiert werden, um eine erhöhte Zahl aktiver Capn12-Moleküle zu erreichen. Schließlich können Agonisten der Capn12 zum Einsatz gelangen, um die Aktivität vorhandener Capn12-Moleküle zu steigern. Bei verminderter Capn12-Expression kann dies nur ein die Therapie unterstützendes Verfahren sein.
- 25 Erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel oder Medikamente können in Form von Tabletten, Granulaten, Pulver, Dragees, Pastillen, Pellets, Kapseln, Zäpfchen, Lösungen, Emulsionen und Suspensionen zur enteralen und parenteralen Verabreichung vorliegen. Vorzugsweise können erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel in Gelen, Lotionen und Cremes zur kutanen Applikation enthalten sein.

- Die jeweilige Dosierung erfindungsgemäßer pharmazeutischer Mittel oder Medikamente und der jeweilige Dosierungsplan obliegen der Entscheidung des behandelnden Arztes. Dieser wird in Abhängigkeit vom gewählten Verabreichungsweg, von der Wirksamkeit des jeweiligen Medikaments, von der Art und Schwere der zu behandelnden Erkrankung, von dem Befinden des Patienten und dessen Ansprechen auf die Therapie eine geeignete Dosis und einen geeigneten Dosierungsplan auswählen. So können z.B. die pharmakologisch wirksamen Substanzen an ein Säugetier (Mensch und Tier) in Dosen von etwa 0,5 mg bis 100 mg pro kg Körpergewicht pro Tag verabreicht werden. Sie können in Einzeldosis oder in mehreren Dosen verabreicht werden.

Die Anwendungsgebiete umfassen Krankheit und Krankheitszustände die im Zusammenhang mit einer unzureichenden Capn12-Expression stehen.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung einer erfindungsgemäßen Capn12 oder eines erfindungsgemäßen Calpain-Proteins zum Screening auf Calpain-Protease-Effektoren. Unter Calpain-Protease-Effektoren sind beispielsweise Substanzen zu verstehen, die die Aktivität der Capn12 und/oder anderer Calpaine beeinflussen  
10 können, wie Aktivatoren oder Inhibitoren, oder solche, die auf die Substrate der Capn12 während der enzymatischen Katalyse wirken können oder Capn12-bindende Moleküle, wie Immunglobuline oder niedermolekulare Capn12-bindende Moleküle, die ebenfalls die biologische Funktion der Capn12 modulieren können. Unter Capn12-bindenden Molekülen versteht man alle natürlichen und synthetischen  
15 Liganden und Interaktionspartner der Capn12.

In einem geeigneten Screening-Verfahren wird beispielsweise die Capn12 oder ein erfindungsgemäßes Calpain-Protein mit einem Analyten inkubiert, welcher einen Effektor einer physiologischen oder pathologischen Capn12-Aktivität enthält, beispielsweise der Cystein-Protease-Aktivität, und die Aktivität der Capn12, gegebenenfalls durch Zugabe von Substraten und Cosubstraten bestimmt.

- 25 Den folgenden Verfahren liegt dagegen die Eigenschaft vieler Effektoren zugrunde, an das Zielprotein zu binden. So kann die Capn12 oder das erfindungsgemäße Calpain-Protein, gegebenenfalls nach entsprechender Derivatisierung, an einem Träger immobilisiert und mit einem Analyten in Kontakt gebracht werden, in welchem wenigstens ein Capn12-Bindungspartner vermutet wird. Die an  
30 die immobilisierte Capn12 oder das immobilisierte, erfindungsgemäße Calpain-Protein gebundenen Bestandteile des Analyten können dann gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase eluiert, bestimmt und charakterisiert werden. Entsprechend kann aber auch der Analyt immobilisiert werden und anschließend auf Bindung von  
35 Capn12-Molekülen oder bindungsfähigen Capn12-Fragmenten an Bestandteile des Analyten hin untersucht werden.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Immunglobuline mit Spezifität für eine erfindungsgemäße Capn12. Solche Immunglobuline umfassen mono- oder polyklonale Antikörper, die an charakteristische Epitope der Capn12 binden können, sowie deren Fragmente. Die Herstellung von Anti-Capn12-Immunglobulinen erfolgt in einer dem Fachmann geläufigen Weise. Mit Immunglobulinen sind sowohl polyklonale, monoklonale, gegebenenfalls humane oder humanisierte Antikörper oder Fragmente davon, single-chain-Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint, sowie Antikörperfragmente, wie

Fv, Fab und F(ab')<sub>2</sub>. Geeignete Herstellungsverfahren sind z.B. in Campbell, A. M., Monoclonal Antibody Technology, (1987) Elsevier Verlag, Amsterdam, New York, Oxford und in Breitling, F. und Dübel, S., Rekombinante Antikörper (1997), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg beschrieben. So können beispielsweise ausgehend von den erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen Peptide synthetisiert werden, die einzeln oder in Kombination als Antigene zur Herstellung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper eingesetzt werden können.

10

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung erfindungsgemäßer Immunglobuline oder erfindungsgemäßer Polynukleotide zur Diagnose von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die im Zusammenhang mit der Capn12-Expression stehen. Dabei kann die Menge, Aktivität und Verteilung der Capn12 oder ihrer zugrunde liegenden mRNA im menschlichen Körper bestimmt werden. Mit Hilfe von Immunglobulinen oder Capn12-bindenden Molekülen läßt sich beispielsweise die Capn12-Konzentration in biologischen Proben, z.B. Zellen oder Körperflüssigkeiten, bestimmen. Mit Hilfe erfindungsgemäßer Polynukleotide läßt sich beispielsweise mittels Northern-Blot-Technik oder RT-PCR die Expression auf mRNA-Ebene beurteilen und beispielsweise eine Minderexpression nachweisen und eine damit verbundene Krankheit diagnostizieren. Außerdem lassen sich mit Hilfe erfindungsgemäßer Polynukleotide in Form geeigneter Sonden Gendefekte oder Mutationen bezüglich des Capn12-Gens und damit die Prädisposition eines Patienten für bestimmte Krankheiten nachweisen. Weiterhin lassen sich aus der Untersuchung einer großen Anzahl von Patienten im klinischen Monitoring Aussagen über genetische Ursachen und Prädispositionen bestimmter Erkrankungen machen.

Die Erfindung wird nun in den folgenden nichtlimitierenden Beispielen unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher beschrieben. Dabei zeigt:

35

Figur 1 einen Sequenzvergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenz der Capn12 mit repräsentativen Mitgliedern der Wirbeltier-Genfamilie der großen Calpain-Untereinheit:

Die vorhergesagte Aminosäuresequenz (hier dargestellt im Ein-Buchstaben-Code) der Splice-Variante Capn12A wurde mit Mitgliedern der wichtigsten Klassen der großen Calpain-Untereinheit verglichen, die sich durch verschiedene C-terminale Domänen unterscheiden. Capn1 besitzt eine klassische Calmodulin-ähnliche, C-terminale Domäne, während Capn5, Capn7 und Capn10 C-terminale Domänen aufweisen, die mit N, T bzw. X bezeichnet sind. Aminosäuren anderer Proteine, die zu denen der Capn12 identisch sind,

sind schwarz hinterlegt. Bindestriche kennzeichnen Lücken, die zur Gegenüberstellung und damit zum bestmöglichen Vergleich der Sequenzen eingefügt wurden. Die drei konservierten Aminosäuren, die Teil des aktiven Zentrums der Calpaine sind, sind mit Pfeilen 5 markiert. Die Calcium-bindenden EF-Hand-Domänen von Capn1 (Lin et al., 1997; Blanchard et al., 1997) sind durch einen Balken über der jeweiligen Sequenz hervorgehoben und abschnittsweise nummeriert. Die aus der Kristallstruktur vorhergesagten (Hosfield et al., 1999) Calpain-Domänen sind ebenfalls gekennzeichnet. Zur 10 besseren Übersichtlichkeit wurden die ersten 122 Aminosäuren des vorhergesagten Capn7-Proteins, die nur dieses Protein aufweist, nicht angegeben und durch ein "Gleichheitszeichen" (=) ersetzt. Die ausgesprochen saure Region in Domäne III, die mit Calcium interagieren kann und möglicherweise als "elektrostatischer Schal-

15 ter" der Protease-Aktivität wirkt, ist durch Kreise über der relevanten Sequenz kenntlich gemacht. Die von der Splice-Variante A abweichenden C-terminalen Enden der aus der 914413-cDNA vorhergesagten Proteinsequenz und der vorhergesagten Proteinsequenzen der Splice-Varianten B und C sind von dem Punkt an gezeigt, an dem 20 sie sich von der Proteinsequenz der Splice-Variante Capn12A unterscheiden. Die EMBL/GenBank-Zugangsnummern der Calpain-Sequenzen sind in der Legende zu Figur 3 angegeben.

Figur 2 die genomische Struktur des Capn12-Gens:

25

A. Schematisches Diagramm der Intron/Exon Struktur des Capn12-Gens. Die schwarzen Rechtecke stehen für Exons der Capn12. Diese sind fortlaufend nummeriert. Das karierte Rechteck kennzeichnet das am äußersten 3'-Ende gelegene Exon von Actn4. Das 30 gepunktete Rechteck kennzeichnet die Exonsequenz, die sich Capn12 und Actn4 teilen. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung beider Gene an. Die Lage der Sequenzwiederholungen, die man in der Sequenz entdeckte, sind oben angegeben. Das Splice-Ereignis zwischen den Exons 9 und 20, aus dem das mRNA-Transkript des 35 Klons 914413 resultierte und die Teilsequenzen, die Splice-Donor- und Splice-Akzeptorstelle der Exons 9 und 20 der Capn12 umgeben, sind ebenfalls angegeben. Große Buchstaben kennzeichnen jeweils die kodierende Sequenz und kleine Buchstaben die Intronsequenz. Die Sequenz CACTG, die der anomalen Splice-Donor- und der Splice-

40 Akzeptorstelle gemeinsam ist und in der das anomale Splice-Ereignis auftrat, ist unterstrichen. Die sich daran anschließende Sequenz der 914413-cDNA, die diese zwei Exons miteinander verbindet, ist ebenfalls angegeben.

B. Ein schematisches Diagramm der Exons 11, 12 und 13 zeigt die 45 alternativen Splice-Varianten A, B und C. Die Sequenz des gemeinsamen Exons 11 ist auf der linken Seite gezeigt und das damit verbundene Exon, das in der jeweiligen Splice-Variante verwendet

wird, auf der rechten Seite. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz ist unter der entsprechenden Nukleotidsequenz angegeben. Die letzten zwei Nukleotide des Splice-Akzeptors in Exon 12, AG, die in Splice-Variante B verwendet werden, sind fettgedruckt dargestellt.

C. Die Tabelle zeigt die Splice-Ereignisse der einzelnen Exons mit der den jeweiligen Splice-Donor und Splice-Akzeptor umgebenden Nukleotidsequenz. Splice-Donor und Splice-Akzeptor sind fettgedruckt dargestellt. Die Größe der jeweiligen Exons und Introns ist angegeben.

Figur 3 den phylogenetischen Stammbaum der Säugetier-Genfamilie der großen Calpain-Untereinheit:

Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL durchgeführt, der Stammbaum wurde mit CLUSTREE erstellt. Die jeweilige Länge der horizontalen Linien ist proportional zum vermuteten phylogenetischen Abstand; die vertikalen Abstände haben keine Bedeutung. Es wurden 1000 Bandwiederholungen durchgeführt und die Werte sind in den inneren Knotenpunkten angegeben. Es wurden vorzugsweise Sequenzen der Maus verwendet. Da diese nicht für Capn8, Capn9 und Capn11 verfügbar sind, wurden ersatzweise die orthologen Sequenzen der Ratte und des Menschen verwendet. Die EMBL/GenBank-Zugangsnummern der Sequenzen sind: Capn1 (AF021847), Capn2 (Y10139), Capn3 (X92523), Capn5 (Y10656), Capn6 (Y12582), Capn7 (AJ012475), Ratte Capn8 (D14480), Mensch CAPN9 (AF022799), Capn10 (AF126867) und Mensch CAPN11 (AJ242832).

Figur 4 eine mRNA-Expressionsanalyse von Actn4 und Capn12:

A. Expression von Actn4 in verschiedenen Mausgeweben. Eine  $^{32}\text{P}$ -markierte Probe, die dem 3'-Ende der Actn4-cDNA der Maus entsprach, wurde an einen Clontech Mouse-Master-Blot hybridisiert. Die Lokalisation der RNAs auf den Filtern ist auf der rechten Seite angegeben. Der Blot wurde gestrippt und mit einer Maus Hprt-Probe hybridisiert (in der Mitte), um die RNA-Beladung zu überprüfen. Die Expositionszeit betrug 48 Stunden.

B. Eine  $^{32}\text{P}$ -markierte Probe wurde an einen Northern-Filter, der RNAs aus der Haut von Mäusen angegebenen Alters trug, hybridisiert. Der Blot wurde zur Überprüfung der aufgetragenen RNA-Level anschließend ein weiteres Mal mit einer  $\beta$ -Actin-cDNA-Probe hybridisiert. Die Positionen der 28S- und 18S-rRNAs sind gekennzeichnet und die spezifische Capn12-RNA-Bande mit einem Pfeil markiert. Die Expositionszeit bei der Capn12 betrug 144 Stunden und 2 Stunden bei  $\beta$ -Actin.

C. Capn12-RT-PCR von RNAs der Haut von Mäusen verschiedenen postnatalen Alters. M, pSM verdaut mit HindIII als Molekulargewichts-



marker, die Größe der Banden ist in Basen angegeben. Neg, negative Kontrolle ohne eingesetzte DNA. Die Sequenzierung der hervorgehobenen PCR-Produkte bestätigte, dass die verstärkte Bande der Capn12-cDNA entspricht.

5

Figur 5 eine in-situ-Hybridisierung an Hautgewebeschnitten aus Mausembryonen:

Auf der linken Seite sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Gewe-

10 bensehnitte dargestellt. Rechts daneben ist das entsprechende Bild der in-situ-Hybridisierung zu sehen. Die Capn12 wird selektiv im Cortex des Haarfollikels exprimiert (irs: inner root sheath; ors: outer root sheath; co: cortex).

### 15 Beispiel 1

#### Screening einer genomischen Bibliothek

Eine Cosmid-Bibliothek, erstellt durch Klonierung von partiell

20 durch Sau3A verdauter Maus-129/Sv-DNA in den Cosmidvektor pSuper-Cos (Stratagene), wurde durch PCR-Analyse unter Verwendung der Capn12-spezifischen Primer 5'-gaatggcgagtggcaacaggaag-3' (SEQ ID NO: 9) und 5'-tggggctcagcacaaaactcat-3' (SEQ ID NO: 10) gescreent. Die Cosmid-DNA wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi

25 Kits gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

#### Beispiel 2

#### cDNA-Amplifikation durch PCR

30

Fünf Mikrogramm Gesamt-RNA wurden mit AMV Reverse Transkriptase unter Verwendung des Promega Reverse Transkription Systems in cDNA transkribiert. Die PCRs wurden in 50 µl Reaktionsvolumen, die 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 0,1% Triton X-100, 2 Units Taq

35 DNA-Polymerase, 50 pmol sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärtsprimer und 0,1 ng cDNA enthielten, mit einem Thermocycling-Protokoll von 35 Zyklen, umfassend 15 s bei 94°C, 30 s bei 55°C und 1 min bei 72°C, durchgeführt. Die Capn12 Vorwärts- und Rückwärtsprimersequenzen zur RT-PCR waren 5'-ttcaagactttctcagc-3'

40 (SEQ ID NO: 11) und 5'-tcgcccccttgagtttattctga-3' (SEQ ID NO: 12). Die Hprt Vorwärts- und Rückwärts-Primersequenzen waren 5'-atgccgacccgcagtcaccagcg-3' (SEQ ID NO: 13) und 5'-ggctttgtatttggcttttcc-3' (SEQ ID NO: 14).

### 45 Beispiel 3

## DNA-Sequenzierung

Ein 20 µl-Reaktionsgemisch, das 8 µl BigDye Reaktion Mix (Perkin-Elmer Biosystems), 500 ng gereinigte DNA und 10 pmol Primer enthielt, wurde 30 Zyklen, umfassend 15 s bei 94°C, 15 s bei 50°C und 2 min bei 60°C, inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines ABI 377 DNA-Sequencers aufgetrennt und die Sequenz durch Dye-Terminator-Fluoreszenz mit Hilfe der Perkin-Elmer Biosystems Sequenzanalyse Software Version 3,3 sequenziert. Weitere Sequenzierung mit synthetisierten Oligonukleotiden erweiterte die DNA-Sequenzen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des SeqMan der Programmreihe DNASTAR zu einem Contig zusammengesetzt.

## 15 Beispiel 4

## Sequenzanalysen

DNA- und Aminosäuresequenzen wurden bezüglich ihrer Homologie mit den nicht-redundanten Nukleotid-, Protein- und EST-Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit Hilfe der Programmreihe-BLAST (Altschul et al., 1990) untersucht. Der Sequenzvergleich und die Gegenüberstellung von Aminosäuresequenzen wurde mit CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) durchgeführt. Die Vorhersage der Exons war mit Hilfe des FGNEESH-Programms möglich, das über den Sanger Centre Web-Server ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)) erhältlich ist. Repetitive Sequenzen wurden unter Verwendung des "RepeatMasker" (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>) identifiziert. Die phylogenetische Analyse wurde mit dem Programm CLUSTREE, erhältlich vom HUSAR-Server des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg ([www.dkfz-heidelberg.de](http://www.dkfz-heidelberg.de)) durchgeführt.

## Beispiel 5

35

## Northern-Blot-Hybridisierung

Die Gesamt-RNA aus Mausgeweben wurde mit Hilfe der Guanidin-Isothiocyanat-Methode (Chomzynski und Sacchi, 1987) isoliert. 10 µg Gesamt-RNA wurden durch Elektrophorese in einem 1,4% (w/v) Agarosegel, das wie bereits beschrieben 2,2 M Formaldehyd enthielt (Sambrook et al., 1989), aufgetrennt und gemäß den Herstellerangaben auf eine Hybond-N-Nylonmembran (Amersham) geblotted. Der Blot wurde mit einem <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Fragment, das den Nukleotiden 33-852 cDNA-Sequenz der Capn12 entsprach in Expresshyb Hybridisierungslösung (Clontech) hybridisiert. Die Bedingungen der Hybridisierung und des hochstringenten Waschens wurden gemäß den

Herstellungangaben gewählt. Der Blot wurde in einem zweiten Schritt mit einer cDNA-Probe des  $\beta$ -Actins hybridisiert, um die RNA-Beladung zu überprüfen.

## 5 Beispiel 6

### In-situ-RNA-Hybridisierung an Gewebeschnitten

Die Capn12-cDNA, die als Template zur Synthese von RNAs, entsprechend den Nukleotiden 33-852 der beschriebenen Sequenz, verwendet wurde, wurde in die EcoRV-Stelle des pBluescripts kloniert. Dieses cDNA-Fragment überlappt nicht mit dem Actn4-Gen.  $^{33}\text{P}$ -markierte Sense- und Antisense-RNAs wurden durch in-vitro-Transkription von Restriktionsenzym-linearisierter Plasmid-DNA in einem Reaktionsvolumen von 12,5  $\mu\text{l}$ , das 1 x Transkriptionspuffer (Puffer für T7- und T3-RNA Polymerasen, von Statagene), 200  $\mu\text{M}$  ATP, CTP, GTP, 40  $\mu\text{Ci}$   $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ -UTP (Amersham), 10 mM DTT, 1  $\mu\text{g}$  linearisierte Plasmid-DNA, 40 Units RNasin (Promega) und 10 Units RNA-Polymerase enthielt, hergestellt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Template-DNA durch Zugabe von 2 Units DNAaseI (Boehringer Mannheim) gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C entfernt. Der Reaktionsansatz wurde extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und in 26  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem  $\text{dH}_2\text{O}$  resuspendiert. Die Embryos wurden in 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert und daraus erhaltene 5  $\mu\text{m}$ -Gewebeschnitte wurden auf vorgereinigte SuperFrost Plus-Objektträger (Menzel-Glaeser) überführt. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen waren wie bereits beschrieben (Dressler und Gruss, 1989). Es wurde eine Hybridisierungstemperatur von 55°C gewählt.

30

## Beispiel 7

### Bestrahlungshybridkartierung

Die DNAs der T31-Bestrahlungshybridkartierungsplatte (Research Genetics) wurden durch PCR mit Hilfe zweier, der Capn12 [Set 1: 5'-gggagggccaggacaaggact-3' (SEQ ID NO: 15), 5'-agggaaggctggaacaatggagaa-3' (SEQ ID NO: 16), Set 2: 5'-gaatggcgagtggcaacaggaag-3' (SEQ ID NO: 17), 40 5'-ctggggctcagcacaaaactcat-3' (SEQ ID NO: 18)] und der Capn5 (Set 1: 5'-cggtgacactggactgggccttgc-3' SEQ ID NO: 19), 5'-aagccgcctgcagagcactgtgg-3' (SEQ ID NO: 20); Set 2: 5'-cgggagtggacgggcccctg-3' (SEQ ID NO: 21), 5'-ctcactttctgccattcctc-3' (SEQ ID NO: 22)) entsprechenden Primers ersetzt, analysiert. Die PCRs wurden in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$ , das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 Unit Taq DNA-Polymerase und 25 ng DNA enthielt, mit einem Thermocyc-

clinging-Protokoll von 35 Zyklen, umfassend 15 s bei 94°C, 30 s bei 60°C und 1 min bei 72°C, durchgeführt. Die Rohdaten wurden zur Analyse bei der Maus-Bestrahlungshybrid-Datenbank, im Jackson Laboratory ([www.jax.org/resources/documents/cmdata/rhmap/](http://www.jax.org/resources/documents/cmdata/rhmap/)) eingereicht.

## Beispiel 8

### Identifizierung der Capn12

10

Zur Identifizierung neuer Calpaingene durchsuchte man die öffentlich zugänglichen EST-Datenbanken. Unter Verwendung der vorläufig erhaltenen Daten, wurde ein neues Mitglied der Säugetier-Genfamilie der großen Calpain-Untereinheit, die durch ein zellspezifisches Expressionsmuster charakterisiert ist, gefunden und charakterisiert.

Die Maus-EST-Datenbank wurde mit Proteinsequenzen von bekannten Wirbeltier-Calpainen unter Verwendung des TBLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) durchsucht. Das translatierte Protein eines 3'-EST, AA1314413, war für die Familie der großen Calpain-Untereinheit typisch. Aus diesem Grund wurde der cDNA-Klon, 914413, der diesem EST-Klon entspricht, in seiner Gesamtheit sequenziert. Die cDNA weist einen PolyA-Schwanz auf und enthält ein offenes Leseraster, dessen vorhergesagtes Protein Homologie zu den Domänen I und II der großen Untereinheit der klassischen Calpaine zeigt. Die vorhergesagte Sequenz weicht allerdings von der klassischen Calpaine im Anschluß an die Domäne II ab und endet kurz darauf (Fig. 1).

30

Drei Beobachtungen deuten an, dass dieser cDNA-Klon von einem anomalen Transkript stammt. Erstens, weist das offene Leseraster keine Homologie zu den Domänen III oder IV anderer Calpaine auf, während alle bisher identifizierten Calpaine eine typische Vier-Domänen-Struktur aufweisen. Zweitens, war es nicht möglich, mit Primern, die aus den beiden Enden der erhaltenen Sequenz konstruiert wurden, aus einer großen Zahl von Gewebe-cDNAs ein Transkript dieser Länge zu amplifizieren. Drittens, wurden zum 3'-Ende von AA1314413 homologe, humane ESTs identifiziert, von denen manche Homologie zu der Calmodulin-ähnlichen Domäne IV der Calpaine zeigten. Daher scheint der cDNA-Klon 914413 das Ergebnis eines atypischen oder fehlerhaften RNA-Splicing-Ereignisses zu sein, das die für die Domänen III und IV kodierenden Exons dieses Calpain-Gens deletiert hat.

45

Um dies überprüfen wurde ein genomische DNA-Cosmidklon isoliert und sequenziert. Man erhielt eine fortlaufende Sequenz (SEQ ID NO: 8) von insgesamt 13116 bp. Die Genvorhersagesoftware (FGENESH) identifizierte ein potentiell Gen mit 21 Exons, mit einer Exon/Intron-Struktur, die typisch für die Genfamilie der Calpaine ist. Darunter sind Exons mit ausgeprägter Homologie zu den Domänen III und IV der klassischen Calpaine. Zur Bestimmung der genauen Exon/Intron-Struktur analysierte man aus der Haut isolierte mRNA mittels RT-PCR. Die Software sagte 20 der 21 Exons vorher, wobei sie einige Fehler in der Position der Donor- oder der Akzeptor-Splice-Stelle erlaubt. Die Intron/Exon-Grenzen des vollständigen Gens sind in Figur 2A gezeigt und in Tabelle 1 zusammengefaßt. Das Nomenklatur-Komitee des Maus-Genoms gab diesem Gen den Namen Capn12. Man fand in der Capn12-Intronsequenz vierfache Sequenzwiederholungen und 16 SINES (short interspersed repeats; 4 B1, 1 B2, 3 B4 und 8 ID; Fig. 2A). Im Vergleich zu der aus der genomischen Sequenz vorhergesagten mRNA-Sequenz scheint der cDNA-Klon 914413 das Ergebnis eines fehlerhaften Splice-Ereignisses zu sein, denn sowohl die Splice-Donor- als auch die Splice-Akzeptorstelle sind atypisch und der größte Teil der Exons der Domänen III und IV wird dadurch deletiert. Der Splice findet zwischen den Exons 9 und 20 innerhalb einer 5-Basenpaarregion, CACTG, statt, die diesen beiden Exons gemeinsam ist (Fig. 2A).

Mittels RT-PCR wurden drei alternative Splice-Varianten der Capn12-mRNA identifiziert (hier Capn12A, Capn12B und Capn12C genannt). Die Splice-Variante A weist ein offenes Leseraster auf, das vermutlich ein Protein aus 720 Aminosäuren ( $M_r$  80,5 kDa) kodiert. Das vorgeschlagene Start-Methionin (cgaATGg) entspricht der minimalen Konsensussequenz der Translationsstartstelle (Kozak, 1996). Weitere 5'-Startstellen werden durch ein TAA-Stopcodon im Leseraster ausgeschlossen, das 39 Nukleotide strangaufwärts dieses ATG lokalisiert ist. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz zeigt Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der Familie der großen Calpain-Untereinheit und kann in die für Calpaine typischen vier Domänen I bis IV unterteilt werden (Fig. 1). Die Domäne II der erfindungsgemäßen Capn12 weist die drei Aminosäurereste (Cys105, His259 und Asn283) auf, die für das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen wesentlich sind (Berti und Storer, 1995). Demgemäß weist die erfindungsgemäße Capn12, wie die meisten klassischen Calpaine, Cystein-Protease-Aktivität auf.

Jede der fünf, der bei der Capn2 beschriebenen  $Ca^{2+}$ -bindenden Sequenzen (Blanchard et al., 1997; Lin et al., 1997) ist in gewissem Ausmaß in der Aminosäuresequenz der Capn12 konserviert (Fig. 1). Die Kristallstruktur der Capn2 brachte eine extrem saure Region in der Domäne III zum Vorschein, die mit  $Ca^{2+}$  interagieren

und als "elektrostatistischer Schalter" der Protease-Aktivität wirken können (Strobl et al., 2000). Die Autoren vermuten, dass die große Zahl saurer Reste in dieser Region die für die Aktivierung notwendige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reduzieren könnte. Die entsprechende Region der Capn12 ist ebenso ausgeprägt sauer (DEEEDDDDEE; Fig. 1). Insgesamt legt die primäre Aminosäuresequenz somit nahe, dass dieses Protein Cystein-Protease-Aktivität aufweist und Calcium bindet. Ein Vergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenz mit denen anderer Vertebraten- und Invertebraten-Calpaine zeigte starke Sequenzhomologie zur Capn1 des Menschen und der Maus (39,9% bzw. 39,75%).

Die Transkripte der Splice-Varianten A und B unterscheiden sich im Splice-Akzeptor des Exons 12, während der Variante C das Exon 12 ganz fehlt. Die vorhergesagten Proteine der alternativen Splice-Varianten B und C zeigen dadurch eine in der Domäne III abweichende Aminosäuresequenz und aufgrund eines Shifts im Leseraster endet die Translation innerhalb dieser Domäne (Fig. 2B). Folglich fehlt ihnen vermutlich auch die Calmodulin-ähnliche,  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende, C-terminale Domäne. Analog dazu wurde bereits gezeigt, dass auch die Capn8 der Ratte und die Capn5 der Maus alternativ gesplicete Transkripte bilden, die Proteine kodieren, denen die C-terminale Domäne fehlt (Sorimachi et al., 1993; Dear et al., 1997). Überraschenderweise war das RT-PCR-Produkt der Splice-Variante B abundanter als das der Splice-Variante A. Somit stellt vermutlich ein Capn12-Protein, dem eine  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domäne fehlt einen beträchtlichen Teil des Capn12-Proteinpools dar. Das RT-PCR-Produkt der Splice-Variante C war dagegen das am wenigsten abundante.

#### Beispiel 9

#### Phylogenetische Analyse der großen Calpain-Untereinheit der Säugetiere

Die jeweils vollständigen Aminosäuresequenzen repräsentativer Mitgliedern aller bekannten großen Calpain-Untereinheiten der Säugetiere wurden einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Dadurch konnte man die Calpaine in drei Hauptgruppen einteilen (Fig. 3). Die erste Gruppe (A) wird durch Capn1, Capn2, Capn3, Capn8 und Capn9 repräsentiert und die zweite Gruppe (B) durch Capn5, Capn6, Capn7, Capn10 und Capn12. Capn11, ein stark abweichendes Calpain (Dear et al., 1999), passt in keine der Gruppen. Gruppe (A) enthält alle Calpaine mit einer Calmodulin-ähnlichen, C-terminalen Domäne, während Gruppe (B) all jene "atypischen" Calpaine enthält, denen vermutlich die Fähigkeit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung fehlt. Eine Ausnahme stellt die Capn12 dar, die im Allgemeinen

der Gruppe (B) ähnlicher ist, abgesehen davon, dass sie eine Calmodulin-ähnliche, C-terminale Domäne aufweist. Darüberhinaus legt die phylogenetische Analyse die Vermutung nahe, dass die Capn12 das älteste Mitglied dieser Gruppe ist. Folglich könnte ein Vorläufer des Capn12-Gens der Begründer der Gene der atypischen großen Calpain-Untereinheit sein, wobei die Capn12 über alternatives Splicing möglicherweise als Quelle sowohl klassischer als auch atypischer Proteine gedient hat.

## 10 Beispiel 10

### Chromosomen-Lokalisation

Die Lokalisation des Capn12-Gens auf Chromosomen der Maus wurde durch PCR-Analyse der T31-Bestrahlungshybridkartierungsplatte mit Hilfe von Primern bestimmt, die innerhalb des Introns 1 des Capn12-Gens binden. Die Rohdaten wurden unter Verwendung der Bestrahlungshybridkarte des Maus-Genoms (Van Etten et al., 1999) und dem dazugehörigen World Wide Web Server analysiert. Der höchste LOD-Wert lag bei 16, in Verbindung mit dem Marker D7Mit72. Andere hohe LODs lagen bei 14,4 in Verbindung mit D7Mit116, 14,4 in Verbindung mit D7Mit77, und 13,9 in Verbindung mit D7Mit267. Diese Marker wurden auf Chromosom 7 bei 9,4 (D7Mit77), 10,7 (D7Mit116), 10,4 (D7Mit72), und 11,0 cM (D7Mit267) lokalisiert. Die schlüssigste Reihenfolge ist: proximal - D7Mit77 - D7Mit116 - D7Mit72 - Capn12 - D7Mit267 - distal. Die Region ist ortholog zum humanen Chromosom 19q13. Das Capn5-Gen der Maus wurde kürzlich ebenfalls mit Hilfe einer Bestrahlungshybridkartierungsplatte der Chromosomen somatischer Zellen der Maus auf dem Maus-Chromosom 7 lokalisiert (Matena et al., 1998). Um den genauen Abstand zwischen Capn5 und Capn12 auf dem Chromosom 7 zu bestimmen, wurde die T31-Platte mit Maus-Capn5-spezifischen PCR-Primern ausgewertet. Der höchste LOD-Wert lag bei 13,4 in Verbindung mit D7Mit321. Andere hohe LODs lagen bei 10,9, 8,5 und 6,9 in Verbindung mit D7Mit184, D7Mit171 bzw. D7Mit39. Die schlüssigste Reihenfolge dieses Locus ist: proximal - D7Mit321 - 7cR - Capn5 - 42cR - D7Mit149 - distal. Der D7Mit321-Marker wurde bei 48,5 cM auf Chromosom 7 lokalisiert. Somit sind Capn5 und Capn12 syntenisch, liegen aber in deutlichem Abstand voneinander auf Chromosom 7. Da die Gene Actn4 und Capn12, wie nachfolgend beschrieben, überlappen, muß Actn4 ebenfalls auf dem Maus-Chromosom 7 liegen. Da das humane Actn4-Gen auf dem Chromosom 19q13 lokalisiert wurde (Kaplan et al., 2000), liegt das humane Capn12-Ortholog sehr wahrscheinlich ebenfalls in dieser Region.

## Beispiel 1

## Expressionsanalyse

- 5 Eine erste in-situ-Hybridisierungsanalyse an Gewebeschnitten aus Mausembryonen, die mit Hilfe der 914413-cDNA zur Herstellung strangspezifischer RNA-Proben durchgeführt wurde, führte dadurch zu verwirrenden Ergebnissen, da die als Kontrolle eingesetzte Sense-RNA, die an den Nonsense-Strang von Capn12 hybridisieren sollte, in jedem Experiment ein Hybridisierungssignal lieferte.
- 10 Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass der Nonsense-DNA-Strang ebenfalls eine RNA kodiert. Untersuchungen der DNA-Gendatenbank identifizierte über 200 ESTs, die dem 3'-Ende des Capn12-Gens entsprechen. Jedoch entsprechen alle ESTs, mit Ausnahme von AA914413, dem nicht-kodierenden Strang. Die Abfolge überlappender ESTs bildete eine Sequenz mit einem offenen Leserahinter, die für das Maus-Ortholog von  $\alpha$ -Actinin-4 (Actn4) kodiert. Die RT-PCR verschiedener Mausgewebe-RNAs bestätigte die Sequenz. Das vorhergesagte Mausprotein ist mit dem humanen Actn4 zu 98,9%
- 20 identisch. Das letzte Exon überlappt mit dem letzten Exon des Capn12-Gens um 330 bp, allerdings in entgegengesetzter Orientierung (Fig. 2). Man konnte kürzlich zeigen, dass Mutationen im humanen Actn4-Gen familiäre segmentale Herdnephritis verursachen kann (Kaplan et al., 2000).
- 25 Eine RNA-Dot-Blot-Analyse und in-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer spezifischen Probe zeigte, dass das Actn4-Gen ubiquitär exprimiert wird (Fig. 4). Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, in einer von über 30 verschiedenen getesteten
- 30 Poly(A<sup>+</sup>)-RNA-Isolierungen aus adultem oder embryonalem Gewebe mit Capn12-spezifischen cDNA-Proben ein Hybridisierungssignal zu erhalten. Obwohl der 914413-cDNA-Klon aus einer Brustdrüsen-cDNA-Bibliothek isoliert wurde, zeigten Northern-Blot- und RT-PCR-Analyse in diesem Gewebe keine signifikanten Expressionslevel. Erst
- 35 eine genauere RT-PCR-Analyse in Verbindung mit einer in-situ-Hybridisierung an Mausembryonen der Stadien dE10,5 bis dE18,5 und verschiedenen adulten Geweben zeigten, dass Capn12 ausschließlich in der Haut exprimiert wird. Hier wird Capn12 im Cortex des Haarfollikels exprimiert (Fig. 5).
- 40 Haare unterliegen einem Zyklus, der bei der Maus ungefähr 25 Tage dauert (Chase, 1965). Der Zyklus ist grob in drei Phasen unterteilt: Die Anagen- (Proliferations-), die Katagen- (Rückbildungs-) und die Telogen-Phase (Ruhephase). Die Rückenhaut der
- 45 adulten Maus enthält Haarfollikel aller Phasen des Haarzyklus. Um genauer zu ermitteln, in welchen Phasen des Zyklus die Capn12-mRNA exprimiert wird, wurden von Mäusen zu verschiedenen



Zeitpunkt nach der Geburt Proben aus der Rücken-  
haut entnommen und die extrahierten RNAs durch Northern-Blot-Hybridisierung un-  
tersucht. Der erste Haarzyklus der Maus verläuft synchron (Chase,  
1965) und somit können relativ reine Haarfollikeln-Populationen  
5 einer spezifischen Zyklus-Phase untersucht werden. Eine  
Capn12-mRNA von ungefähr 3,5 kb kann in der Anagenphase (ungefähr  
P1-P16), aber nicht in der Telogenphase (P19-P25) (Fig. 4B) nach-  
gewiesen werden. Die mRNA erreicht ihr höchstes Expressionslevel  
ungefähr am Tag P12, in der Mitte der Anagenphase. Eine RT-PCR-  
10 Analyse derselben Hautproben bestätigte dieses Ergebnis (Fig.  
4C). Somit zeigt Capn12 ein hochspezifisches mRNA-Expressionsmu-  
ster.

Die Genfamilie der großen Calpain-Untereinheit kann aufgrund ver-  
15 schiedener Kriterien unterteilt werden, wie oben erwähnt z.B.  
aufgrund der Proteinstruktur. Ein weiteres Klassifizierungskrite-  
rium ist die ubiquitäre gegenüber der gewebespezifischen Expres-  
sion. Capn1, Capn2, Capn7 und Capn10 scheinen ubiquitär expri-  
miert zu werden, während die anderen Calpaine durch unterschied-  
20 lich stark ausgeprägte gewebsspezifische Expression charakteri-  
siert sind. Beispielsweise wird Capn9 vorwiegend im Darm und Ma-  
gen exprimiert, ist aber auch in anderen Geweben nachweisbar (Li  
et al., 1998). Dagegen wird Capn11 offenbar ausschließlich in be-  
stimmten Zellen der Testis exprimiert wird (Dear und Boehm,  
25 1999). Darüber hinaus werden manche Calpain-Gene entwicklungspe-  
zifisch exprimiert. Capn5 wird beispielsweise im embryonalen Thy-  
mus in den T-Zell-Vorläufern exprimiert, während nach der Geburt  
die Expression im Thymus herunterreguliert wird (Dear und Boehm,  
1999).

30

## REFERENCES

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman,  
D.J. (1990). Basic local alignment sequencing tool. J. Mol. Biol.  
35 215:403-410
- Berti, P. J. und Storer, A. C. (1995). Alignment/Phylogeny of the  
papain superfamily of cysteine proteases. J. Mol. Biol.  
246:273-283
- 40 Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J.S.C., Davies,  
P.L., Elce, J.S. & Cygler, M. (1997). Structure of a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding  
domain reveals a novel EF-hand and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced conformational  
changes. Nature Struct. Biol. 4:532-538.

45

- Braun, Engel, M., Theisinger, B., Welter, C. und Seifert, M. (1999). CAPN 8: isolation of a new mouse calpain-isoenzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 260:671-675
- 5 Carafoli, E. und Molinari, M. (1998). Calpain: a protease in search of a function? Biochem. Biophys. Res. Commun. 247:193-203
- Chan, S.L. und Mattson, M.P. (1999). Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. J. Neurosci. 10 Res. 58:167-190
- Chase, H.B. (1965). Cycles and waves of hair growth. In: Lyne, A.B., Short, B.F. (Eds.). Biology of the Skin and Hair Growth. Angus und Robertson, Sydney, pp. 462-465
- 15 Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159
- 20 Dear, T.N. und Boehm, T. (1999). Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes Capn5, Capn6 and Capn 11 during development. Mech. Dev. 89:201-209
- Dear, T.N., Matena, K., Vingron, M. und Boehm, T. (1997). A new 25 subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: Implications for calpain regulation and evolution. Genomics 45:175-184
- Dear, T.N., Moller, A. und Boehm, T. (1999). CAPN11: A calpain 30 with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. Genomics 59:243-247
- Dressler, G.R., Gruss, P., 1989. Anterior boundaries of Hox gene expression in mesoderm-derived structures correlate with the 35 near gene order along the chromosome. Differentiation 41, 193-201
- Franz, T., Vingron, M., Boehm, T. und Dear, T.N. (1999). Capn7: A highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain. Mamm. Genome 10:318-321
- 40 Hardman, M.J., Sisi, P., Banbury, D.N. und Byrne, C. (1998). Patterned acquisition of skin barrier function during development. Development 125, 1541-1552
- 45

Hosfield, C.M., Elce, J.S., Davies, P.L. and Jia, Z. (1999). Crystal structure of calpain reveals the structural basis for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. EMBO J. 18:6880-6889

5

Kaplan, J.M., Kim, S., North, K.N., Rennke, IL, Correia, L., Tong, H.Q., Mathis, B.J., Rodriguez-Perez, J.C., Allen, P.G., Beggs, A.H. und Pollak, M.R. (2000). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. Nat. Genet. 24, 251-256

Kozak, M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. Mamm. Genome 7:563-574

15 Lee, HA., Sorimachi, H., Jeong, S-Y., Ishiura, S. und Suzuki, K. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. Biol. Chem. 379, 175-183

20 Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K., Carson, M., Jin, L., Yuen, P.W., Takano, E., Hatanaka, M., DeLucas, L.J. und Narayana, S.V. (1997). Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. Nat. Struct. Biol.

25 4:539-547

Matena, K., Boehm, T. und Dear, T.N. (1998). Genomic organization of mouse Capn5 and Capn6 genes confirms that they are a distinct calpain subfamily. Genomics 48:117-120

30

Mellgren, R.L. (1997). Evidence for participation of a calpain-like cysteine protease in cell cycle progression through late G1 phase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 236:555-558

35 Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannikoulchait, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., Hillaire, D., Passos-Bueno, M., Zatz, M., Tischfield, J.A., Fardeau, M., Jackson, C.E., Cohen, D. und Beckmann, J.S. (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3

40 cause Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. Cell 81:27-40

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 7.43-7.45

45

Schoenwaelder, S.M., Yuan, Y., Cooray, P., Salem, H.H. und Jackson, S.P. (1997). Calpain cleavage of food adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of 5 fibrin clots. J Biol. Chem. 272:1694-1702

Sorimachi, H., Ishiura, S. und Suzuki, K. (1993). A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without  $\text{Ca}^{2+}$ -10 binding domain. J. Biol. Chem. 268:19476-19482

Sorimachi, H., Ishiura, S. und Suzuki, K. (1997). Structure and physiological function of calpains. Biochem. J. 328: 721-732.

15 Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A, Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K. und Bode, W. (2000). The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. Proc. Natl. Acad. 20 Sci. USA 97:588-592

Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties 25 and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22:4673-4680

Van Etten, W.J., Steen, R.G., Nguyen, H., Castle, A.B., Slonim, D.K., Ge, B., Nusbaum, C, Schuler, G.D., Lander, ES. und Hudson, T.J. (1999). Radiation hybrid map of the mouse genome. Nat. Genet. 30 22:384-387

Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? Trends Neurosci. 23:20-26.

35 Wang, K.K. und Yuen, P.W. (1997). Development and therapeutic potential of calpain inhibitors. Adv. Pharmacol. 37:117-152

## Patentansprüche

- 5 1. Calpain-Protease 12 (Capn12), dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aminosäuresequenz, umfassend die Aminosäuren 1 - 342 der SEQ ID NO: 1 aufweist, sowie deren funktionale Äquivalente.
2. Capn12 gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie  
10 eine Aminosäuresequenz, ausgewählt unter SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 aufweist, sowie deren funktionale Äquivalente.
3. Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie Cystein-Protease-Aktivität aufweist.  
15
4. Calpain-Protein, dadurch gekennzeichnet, dass es wenigstens eine Capn12 gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche aufweist.  
20
5. Polynukleotid, das für eine Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert, sowie deren funktionale Äquivalente und damit hybridisierbare oder dazu komplementäre Polynukleotide.
- 25 6. Polynukleotid gemäß Anspruch 5 mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt unter SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 8.
7. Expressionskassette, umfassend wenigstens eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit einem Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 5 und 6.  
30
8. Rekombinanter Vektor, der ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 7 trägt.  
35
9. Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 8.
- 40 10. Verfahren zur Herstellung einer Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei man einen Mikroorganismus, welcher die Capn12 produziert, kultiviert und die Capn12 aus der Kultur isoliert.

11. Verwendung einer Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder eines Calpain-Proteins gemäß Anspruch 4 als Cystein-Protease.
- 5 12. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend eine Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, ein Calpain-Protein gemäß Anspruch 4 oder einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 8.
- 10 13. Verwendung einer Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Calpain-Proteins gemäß Anspruch 4 oder eines rekombinanten Vektors gemäß Anspruch 8 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die im Zusammenhang mit einer unzureichenden Expression der Capn12 stehen.
- 15 14. Verwendung einer Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder eines Calpain-Proteins gemäß Anspruch 4 zum Screening auf Calpain-Protease-Effektoren.
- 20 15. Immunglobulin mit Spezifität für eine Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
- 25 16. Verwendung von Immunglobulinen gemäß Anspruch 15 oder Capn12-bindender Moleküle zur Diagnose von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die im Zusammenhang mit einer Capn12-Expression stehen.
- 30 17. Verwendung von Polynukleotiden gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6 zur Diagnose von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die im Zusammenhang mit einer Capn12-Expression stehen.

35

40

45

*Fig. 1*

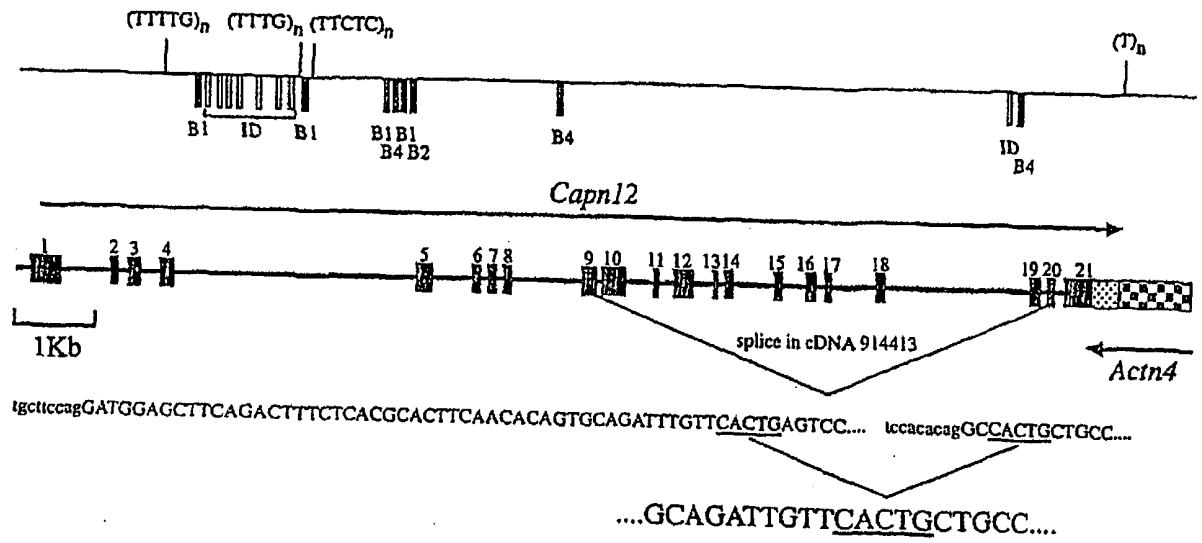


Fig. 2a

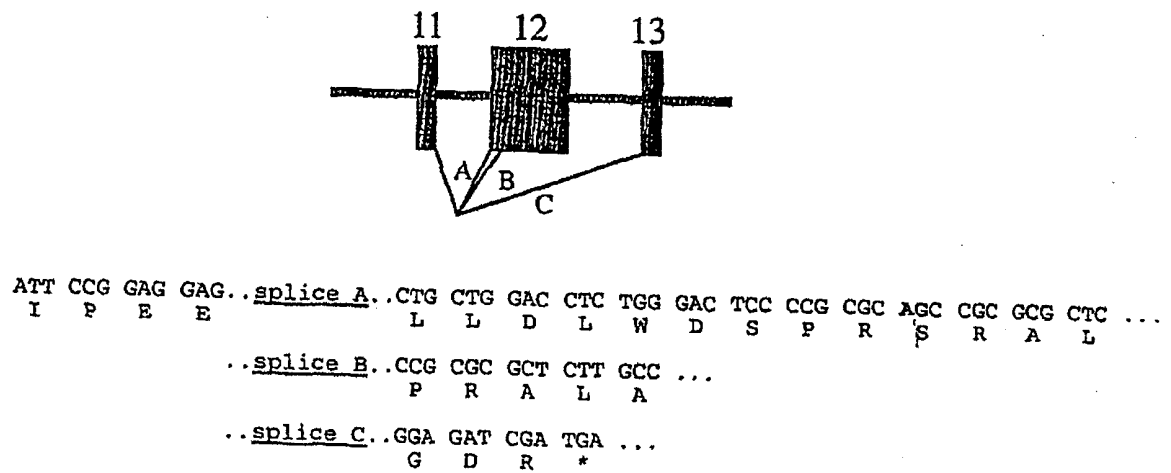


Fig. 2b



Exon-Intron Organisation des *Capn12* - Gens der Maus

Exon Nr.	Exon-Größe (bp)	Intron-Größe (bp)	Splice-Donor <sup>a</sup>	Splice-Akzeptor
1	305	590	G AGG CCG CATgtaaagtggg	taatctccagGAG TTT TGT G
2	70	149	GGA AGC TTG Ggtgagcccc	ctctctctagGA AAC TGC TG
3	119	234	C CAT TTT CAGgtagatcca	tcttccaccagCTA TGG CAG T
4	134	2648	CC TAT GGC AAgtaaggactt	gtctccaacagG CTC CAT GGC
5	169	474	T ACT GGC CTGgtgagagctg	ctctctccagAGT GAT OGG G
6	75	87	C ACG CAC AAGgtgagacgct	ttgtcttcagATG TCT CTG G
7	86	79	GG AGT GAC AGgtaggatggg	gtctctctcagC TGC CCA GGC
8	75	800	GC GAG TTC TGgtgagttctt	tgctttccagG ATG GAG CTT
9	164	83	CCC AGC GCT Ggtgaggcctt	tttctgtcagAA AAC TTC TG
10	236	363	C GTG TTC CAGgtgaggccaa	cttctctgcagATT OCG GAG G
11	12	181 <sup>b</sup>	T CCG GAG CAGgtgggtatcag	ctgcccgcagCTG CTG GA CC
		210 <sup>b</sup>	T CCG GAG CAGgtgggtatcag	cccccgcagCCG OCG GCT C
12A <sup>b</sup>	209	252	AC ACC GCA Gltgagccagtg	taacttgtagG GAG ATC GAT
12B <sup>b</sup>	180			
13	43	81	C GGC CTC CAGgtgaggactg	ctccccacagGCC CCC TAC A
14	60	526	G GCT GGA CAGgtgaagtctg	tcttgattagGAG GAG GAA C
15	58	316	CTG GAA CCT Ggtgagtttgg	ttttttgtagCG AGG GCC A
16	71	97	G TGT TTT GGGgtacgtggggg	tcacttgcagCGT GGG CAA A
17	63	524	G TCA TGG CAGgtaggtgagg	caacttccagGCC ACA TTT G
18	79	1629	ACT GCT GCA Ggtgtggctga	ctctctgttagGC TTC CAC CT
19	117	87	TGC ATC TTC Cgtgagtactc	toocacacagGC CAC TGC TG
20	59	80	C CAC AAA CAGgtgagctggc	ttctcttcagTGG TCG GAG G
21	624			

<sup>a</sup> Intron- und Exonsequenzen sind in Klein- bzw. Großbuchstaben dargestellt. Exonsequenzen sind als Codon-Triplets dargestellt.

Die gleichbleibenden ersten und letzten Nukleotide der Introns sind fettgedruckt wiedergegeben.

<sup>b</sup> Zwei alternative Splice-Akzeptor-Stellen am Beginn von Exon 12 werden verwendet (Details im Text).

**Fig. 2c**

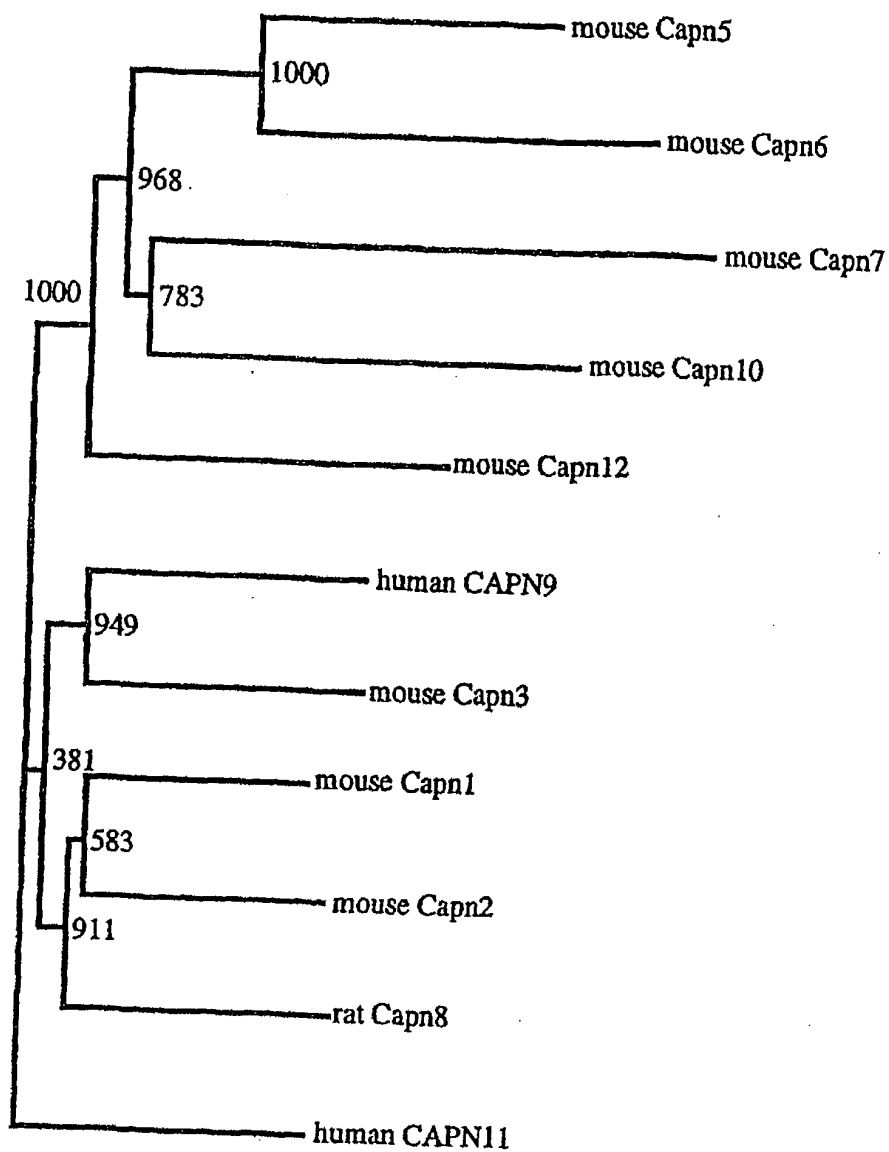


Fig. 3

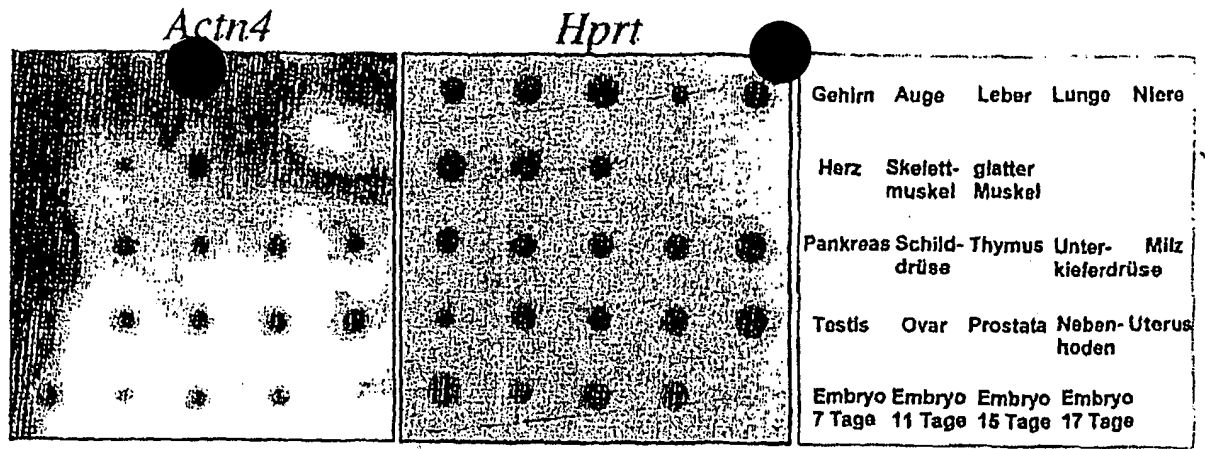


Fig. 4a

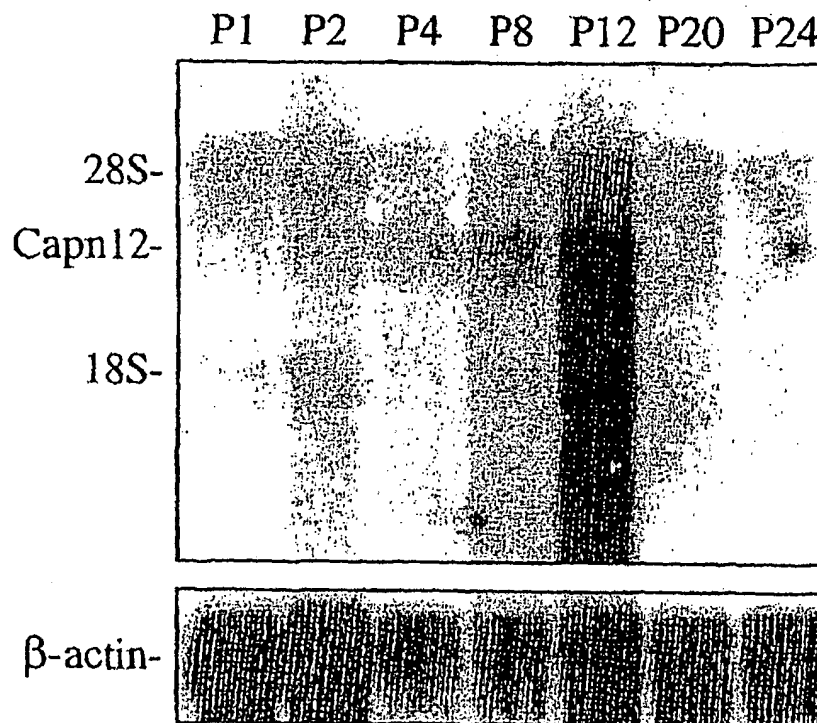


Fig. 4b

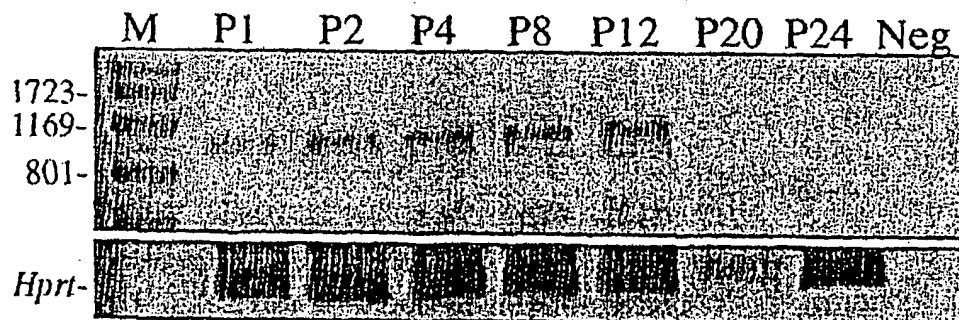


Fig. 4c

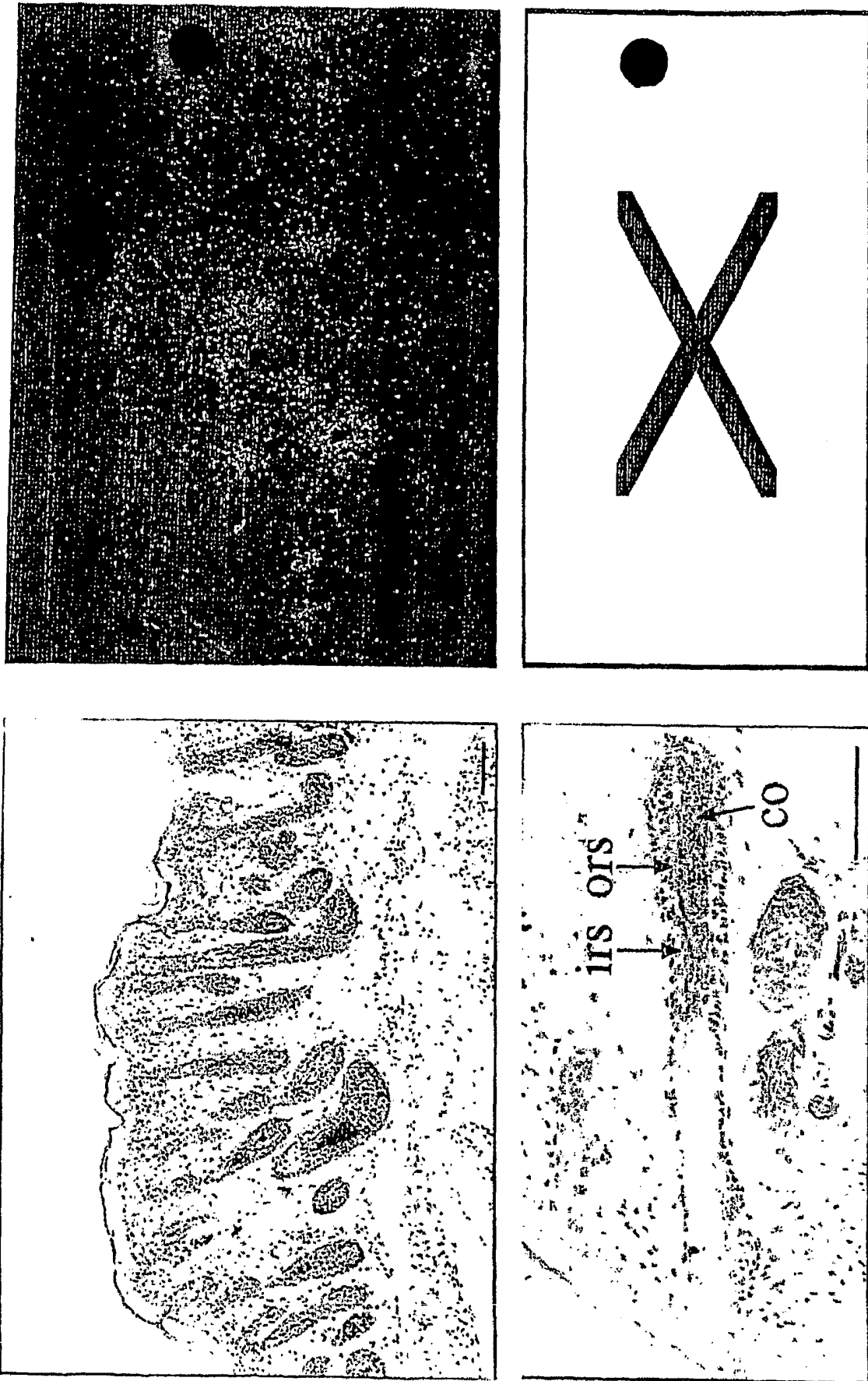


Fig. 5

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

&lt;120&gt; Capn12

&lt;130&gt; M/41195

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 22

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 1

Met	Ala	Ser	Gly	Asn	Arg	Lys	Val	Thr	Ile	Gln	Leu	Val	Asp	Asp	Gly
1				5					10					15	

Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	Pro	Gln	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Asn	Tyr
			20					25						30	

Glu	Ala	Ile	Arg	Arg	Ala	Cys	Leu	Asp	Ser	Gly	Ile	Leu	Phe	Arg	Asp
		35					40						45		

Pro	Cys	Phe	Pro	Ala	Gly	Pro	Asp	Ala	Leu	Gly	Tyr	Asp	Lys	Leu	Gly
	50					55						60			

Pro	Asp	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Gly	Val	Glu	Trp	Lys	Arg	Pro	His	Glu
65					70					75					80

Phe	Cys	Ala	Glu	Pro	Gln	Phe	Ile	Cys	Glu	Asp	Met	Ser	Arg	Thr	Asp
			85							90					95

Val	Cys	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Cys	Trp	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala
		100						105						110	

Ser	Leu	Thr	Leu	Tyr	Pro	Arg	Leu	Leu	Tyr	Arg	Val	Val	Pro	Pro	Gly
		115						120						125	

Gln	Gly	Phe	Gln	Asp	Gly	Tyr	Ala	Gly	Val	Phe	His	Phe	Gln	Leu	Trp
		130						135						140	

Gln Phe Gly Arg Trp Val Asp Val Val Val Asp Asp Lys Leu Pro Val  
 145 150 155 160

Arg Glu Gly Lys Leu Met Phe Val Arg Ser Glu Gln Arg Asn Glu Phe  
 165 170 175

Trp Ala Pro Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu His Gly Ser Tyr  
 180 185 190

Glu Val Met Arg Gly Gly His Met Asn Glu Ala Phe Val Asp Phe Thr  
 195 200 205

Gly Gly Val Gly Glu Val Leu Tyr Leu Arg Gln Asn Thr Pro Gly Val  
 210 215 220

Phe Ala Ala Leu Arg His Ala Leu Ala Lys Glu Ser Leu Val Gly Ala  
 225 230 235 240

Thr Ala Leu Ser Asp Arg Gly Glu Ile Arg Thr Asp Glu Gly Leu Val  
 245 250 255

Lys Gly His Ala Tyr Ser Val Thr Gly Thr His Lys Met Ser Leu Gly  
 260 265 270

Phe Thr Lys Val Arg Leu Leu Arg Leu Arg Asn Pro Trp Gly Arg Val  
 275 280 285

Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Asp Ser Cys Pro Arg Trp Asp Met Leu  
 290 295 300

Pro Ser Glu Trp Arg Asp Ala Leu Leu Val Lys Lys Glu Asp Gly Glu  
 305 310 315 320

Phe Trp Met Glu Leu Gln Asp Phe Leu Thr His Phe Asn Thr Val Gln  
 325 330 335

Ile Cys Ser Leu Ser Pro Glu Val Leu Gly Pro Ser Pro Ala Gly Gly  
 340 345 350

Gly Trp His Ile His Ile Phe Gln Gly Arg Trp Val Arg Gly Phe Asn  
 355 360 365

Ser Gly Gly Ser Gln Pro Ser Ala Glu Asn Phe Trp Thr Asn Pro Gln  
 370 375 380

Phe Arg Leu Thr Leu Leu Glu Pro Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp  
 385 390 395 400

Glu Glu Gly Pro Trp Gly Gly Trp Gly Ala Ala Gly Arg Gly Pro  
 405 410 415

Ala Arg Gly Gly Arg Val Pro Lys Cys Thr Val Leu Leu Ser Leu Ile  
 420 425 430

Gln Arg Asn Arg Arg Cys Leu Arg Ala Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Thr  
 435 440 445

Val Gly Phe His Val Phe Gln Ile Pro Glu Glu Leu Leu Asp Leu Trp  
 450 455 460

Asp Ser Pro Arg Ser Arg Ala Leu Leu Pro Gly Leu Leu Arg Ala Asp  
 465 470 475 480

Arg Ser Val Phe Cys Ala Arg Arg Asp Val Ser Arg Arg Cys Arg Leu  
 485 490 495

Pro Pro Gly His Tyr Leu Val Val Pro Ser Ala Ser Arg Val Gly Asp  
 500 505 510

Glu Ala Asp Phe Thr Leu Arg Ile Phe Ser Glu Arg Ser His Thr Ala  
 515 520 525

Val Glu Ile Asp Asp Val Ile Ser Ala Asp Leu Asp Ala Leu Gln Ala  
 530 535 540

Pro Tyr Lys Pro Leu Glu Leu Glu Leu Ala Gln Leu Phe Leu Glu Leu  
 545 550 555 560

Ala Gly Glu Glu Glu Glu Leu Asn Ala Leu Gln Leu Gln Thr Leu Ile  
 565 570 575

Ser Ile Ala Leu Glu Pro Ala Arg Ala Asn Thr Arg Thr Pro Gly Glu  
 580 585 590

Ile Gly Leu Arg Thr Cys Glu Gln Leu Val Gln Cys Phe Gly Arg Gly  
 595 600 605

Gln Arg Leu Ser Leu His His Phe Gln Glu Leu Trp Gly His Leu Met  
 610 615 620

Ser Trp Gln Ala Thr Phe Asp Lys Phe Asp Glu Asp Ala Ser Gly Thr  
 625 630 635 640

Met Asn Ser Cys Glu Leu Arg Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Phe His  
 645 650 655

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



130

135

140

Gln Phe Gly Arg Trp Val Asp Val Val Val Asp Asp Lys Leu Pro Val  
 145 150 155 160

Arg Glu Gly Lys Leu Met Phe Val Arg Ser Glu Gln Arg Asn Glu Phe  
 165 170 175

Trp Ala Pro Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu His Gly Ser Tyr  
 180 185 190

Glu Val Met Arg Gly Gly His Met Asn Glu Ala Phe Val Asp Phe Thr  
 195 200 205

Gly Gly Val Gly Glu Val Leu Tyr Leu Arg Gln Asn Thr Pro Gly Val  
 210 215 220

Phe Ala Ala Leu Arg His Ala Leu Ala Lys Glu Ser Leu Val Gly Ala  
 225 230 235 240

Thr Ala Leu Ser Asp Arg Gly Glu Ile Arg Thr Asp Glu Gly Leu Val  
 245 250 255

Lys Gly His Ala Tyr Ser Val Thr Gly Thr His Lys Met Ser Leu Gly  
 260 265 270

Phe Thr Lys Val Arg Leu Leu Arg Leu Arg Asn Pro Trp Gly Arg Val  
 275 280 285

Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Asp Ser Cys Pro Arg Trp Asp Met Leu  
 290 295 300

Pro Ser Glu Trp Arg Asp Ala Leu Leu Val Lys Lys Glu Asp Gly Glu  
 305 310 315 320

Phe Trp Met Glu Leu Gln Asp Phe Leu Thr His Phe Asn Thr Val Gln  
 325 330 335

Ile Cys Ser Leu Ser Pro Glu Val Leu Gly Pro Ser Pro Ala Gly Gly  
 340 345 350

Gly Trp His Ile His Ile Phe Gln Gly Arg Trp Val Arg Gly Phe Asn  
 355 360 365

Ser Gly Gly Ser Gln Pro Ser Ala Glu Asn Phe Trp Thr Asn Pro Gln  
 370 375 380

Phe Arg Leu Thr Leu Leu Glu Pro Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ttccctcaag ggatttaac ctcacgccat ctctcatggt ccttgac atcggcagcc 3660  
catcctttat ctgggatta ggctaccgtg cgctggaagg cctgacaagt ccccataggc 3720  
atcgccctca caggctccca gagcctcaaa gggtgagga gagttgagaa ttctggtgca 3780  
gctcttccat ggcttccaga ctgcacagtt tcatggaccc tagagatgag aggcctagca 3840  
tgtgtcagat gagtctccca cctcatctct gaatagttca gggattgagc ctactcctat 3900  
tatcacagta gtactaagtg tactgaggca ggaggattgc aagtttgagg gcagactgag 3960  
atgcatagca ataccatgtc taaacaaaac acaaacaccc aattagctga gcacttatag 4020  
aacaactttg tctctagtac tctgagagca gaggcaggtg gatctctggg actctgagac 4080  
aaatgtggtc tacagagtga gttcttggtc agtcaaagct tgggtctcaa gacaagaggg 4140  
agggtctggg gctgggggtg ggaatctgta gagatggctc agtgtaaga gcactgggtg 4200  
ctcttccaga agacctgact tttattccca gtcacgacta tgtgtaactt cagtaccagg 4260  
gatctgaggc ttccatggac actgcacaca tgacatgtgg tgcacagaca tacatgcagg 4320  
caaaacacat acatatagaa attacatata catacacaca attggggaat aggtcctgga 4380  
gaccttatt ctgatagagc tctgcccac gatgttctgt accttagacc tacttctacc 4440  
tgctccaaca ggctccatgg ctctacgag gtaatgcgag gaggtcacat gaacgaggct 4500  
tttgtggact ttacaggagg cgtgggtgag gttctctact tgagacaaaa cactccagg 4560  
gtctttgctg ccttccgca cgcattggcc aaggagtcct ttgtgggtgc tactgccctg 4620  
gtgagagctg ggctcccatg tggacctcca ctagaccaac ttagtcaagg atgaggtggg 4680  
aggggagcct tagcatccag tgtctttctt acctctgctg gttgactccc cctctcccc 4740  
cagatcctca atgatagatt ctaggccaga gttctacata taagctacat cctcccccc 4800  
acctccattt ttacttttca tttcgaggca aagtctaagt tacttacag ggccttgaac 4860  
atgtcacgca tcagccttct gtgttgctcg aatcccaggc ctgtagtgca gagtccgggt 4920  
ttcccccatc tctatctgt cactccaatt gctctccca gctctctctc tgagtcctt 4980  
ggcattttat gctgctttga gagctccggg attggaagca tgaggatggg ttggggggct 5040  
ggggagagat gcttctacct cccacccgag gtcacaatc ttgcctcct ccagagtgat 5100  
cggggtgaga tccgcacaga tgaagggtc gtgaaggac atgcttattc tgtcacaggc 5160  
acgcacaagg tgagacgctc cataggtgga ctgggctaac cctacctct gtaacgatgc 5220  
cctcacacc acctcactg atgactttgt ctacagatgt ctctgggctt caccaagggt 5280  
cggctgctgc ggctgaggaa cccctggggc cgcgtggagt ggtccggggc ctggagtgc 5340  
aggtaggatg ggcttggggg ggggtggggc gtggtcaggg cgtggctcc acatgtctt 5400  
ctctcacatt ggtctcctca gctgccacg ctgggacatg ctccctctg agtggcgaga 5460  
tgccctgctt gtgaaaaagg aggatggcga gttctggtga gttcttaggg acccactcta 5520  
ccgggtgggag gtccgctggg acaggagcct tagaacgcag ggccagaaag gacacagaga 5580  
aactcatggg atggatgggt catgttgca agcaatggtc cctatcagct gtgatgtggg 5640  
aatctaaatc tatttttttg caaagttaga gcagaagcag taagatcagg actataaagg 5700  
gcattgtttt cagagggaga acactgaaat taggttagct taaaactcac tatatagacc 5760  
aggctagtc ttgtctcatg gccatatttt gacctcagct ttccaaaagg caaggatgga 5820  
attacaggca tgaggggatc taaaggaatg tagagtcagt gattttggga gatttaattg 5880  
gaatagaacc atatttaggg ggaatctggg gaggttttaa ctatatataa tttaaaactt 5940  
ttctatttct ccattgggtg tgagaggatc agtctctcc ttccactgtg agatgctaag 6000  
gtcaaactct cagcttgca ggcttgga gacagtggct ttattggctc tgccattttc 6060  
ccagacctat ttgcgggttt tctaagtcta atttgaatat gttgagaggc gtttgtgact 6120  
ccttcccag ataatgtatt tgtgaggact tggagacatt gccaaggcct gaaggcttcg 6180  
gggtttctg agattggaag ttattctgca gtctttaggg aactgggggc acttctgggg 6240  
ccctcaage cgggctctgg agtggctggg tacttttcac ggctgggtgct ttccaggatg 6300  
gagcttcaag actttctcac gcacttcaac acagtgcaga tttgttccact gagtccctgag 6360  
gtgttggggc ccagccctgc tggcggcggc tggcatatcc acatcttcca gggccgctgg 6420  
gtgcgaggct tcaactccg tgggagtcag cccagcgtg gtgaggcctt ggggacctt 6480

gagaagcaaa cttgggtgag gcttgtggca ggatgggaac tccacctcct tcttttctgt 6540  
cagaaaactt cccaac cccaggttcc ggctgacact gctgacct gatgaggaag 6600  
aggatgacga tgatgaagag ggacctggg gaggtctggg agcgggagg gcccggggcc 6660  
cggcgagagg aggcgagtc cccaagtga cggtcctgtt gtcactcatc cagcgcaacc 6720  
gccggtgtct gagggccaag ggcctcactt acctcactgt gggcttccac gtgttccagg 6780  
tgaggccaag gtcaagtga gggctctggag gggcagaggg tcacaagggc accgttatgg 6840  
gcagaagtgt actgtgggtt caaagaggag tgccactgca gatatcattg gagaaagga 6900  
ttcaggaaca ggaagagaaa aacgttgagg gtccgagagc aggaggggac caaagggcca 6960  
gagaagggat gtgggcacag gtggaaagga aagggttggg ggaggggtca gagaggacct 7020  
aggtcaaaga tgaggaaata ttaagggttc agaaagaagg aggggtgtga gaggtgtgga 7080  
aggggaggaa ggaaatctgc gagctctcca accttcattc ccttgggtgtt ttcttctgc 7140  
agattccgga ggaggtgggt atcagatgcg gctccagaat taccctaggg cttgatggac 7200  
cagggcagga agcctgggaa cacgggaggg cctggccaga cagtctgggt gtgtgtggga 7260  
aatggcgcgg tggaggctat cagaggggtt ggtggggagc tcgggtgggt ggtggtcatg 7320  
ccccctgcc cgcagctgct ggacctctgg gactccccgc gcagccgcgc gctcttgccg 7380  
ggactgctgc gcgccgaccg ctcggttttc tgcgccgcgc gcgacgtgag ccgtcgctgt 7440  
cgctgcccgc ctggccacta cctgggtggt cccagcgctt cgcgcgtagg cgatgaagcc 7500  
gacttcactc tgcgcatctt ctcgagcgc agccacaccg cagtgtgagc cagtgtacc 7560  
tcataagcc ttaccagggg catcccgacc ccggcccagg aacctcaatc tagaatcata 7620  
ggccccgcc ctggcaccaa gcccccca ggaatcaca atccctgtcc ctgcatcttc 7680  
agccctgcc taccagggg ttccctctc ccaaaacc acactgcctt tgactatatc 7740  
cacttctct gctgagacct ccggccgaac gcctccctt tttctgtaac ttgcagggag 7800  
atcgatgacg tgatcagcg agacctggac gccctccagg tgaggactgt tgtaggtggg 7860  
gacaagactc tagagggcgg gcagggctt ggaaggaac tgaactctc ctccccacag 7920  
gccccctaca agccctgga gctggagtgt gcacagctat ttttgagct ggctggagag 7980  
gtaagagtgc gggactggg atgccagcc aaatgacaac gagctccct ctctccttag 8040  
atgtcttata aaacaaaaca aacctaaac caaatcaaac actgtagatc aggatatcca 8100  
ggaacagcta tgtattctgt agcccagact ggcctccttc gggttacca tgctgggtt 8160  
aaacctgagt cactttgctg gggtttggg tatctttct ttattctggg aatgctcaa 8220  
ttgtctcaag gcctttgctg ggtctgcacc tcttctct gaaggttccc atccctgcc 8280  
agactcaaaa catctttccc aagtgccttc ctctgtcact tgcccacggt gggccccac 8340  
agtgtgtctc ccaccactgt cctgaccact ctgaggacag gcctgcctc tctagctgga 8400  
ccctaggaag gcagccacag ccatgccgtc agtcctatgg agcacagggc ctggcccaga 8460  
gtggattgtt ggctggatgt tttgaagtgg gttctttcct gattaggagg aggaactcaa 8520  
cgctcttcag ctgcagacct taataagcat tgccttgga cctggtgagt ttggctggag 8580  
gttgaggtgg gggctcttc aactgaagca ccatagctat acaggctcta tgtgtgatga 8640  
agctagggcg ccaggcacag gaacaggact tcctacaagg ttatgtgagg gccatgatca 8700  
ctcgagcca cgcacctt cctctaagag gtgggggcag aaatgtagaa cccagcttg 8760  
gttggttctt caggcatgaa ctctcagcac ctgcttctat gatagcca ctgcaggag 8820  
ttagtctgca gtgctcttgc agtgttgcc tacatgcaag ggggtgctgga ttttttgca 8880  
gcgagggcca acaccaggac ccctggagag attgggctta ggacctgca acagcttgtg 8940  
cagtgttttg gggtagctgg ggtagtatat ggagaggagg gacagggatg ctgggctttt 9000  
ccttgccctt taggggacat tgattgtaac cagggtgctt cacttgcagc gtgggcaaag 9060  
actgtcccta caccacttcc aggagctctg gggccatctc atgtcatggc aggtaggtga 9120  
gggttgagag cagctgcctc cttctagaca ctgatattgt gtggatggac aaagggggca 9180  
ctgccaacga ggatataaag tccctgtcac ccatagtg ccctctgagg gcaccaaag 9240  
tagtgatcta gagctgcctc tggttcctgt tggaaatcca ggtcccagct cagcttcttc 9300  
cttgccaggt gaccaaccac aggcctgtca cctcccttc gaggagctc tgcttagcta 9360

ctaattgggta ctttcaag gggaggagct caagggtccc agaatatc atagtataa 9420  
ctccctgcta cttctcttc cctaaccttc gtgggtatag ggatttgaac ttgtcccca 9480  
cagcctggga gcttgtctcc ttctcacagg tgtagagtgg tgcccaccca gaagccacca 9540  
gagctgaggc cgtctcttag ctacttcaag gtgcaagagc atcactctgg ggctggactt 9600  
gtgatactga ctcccacctg cctctccacc ttccaggcca catttgacaa gtttgatgaa 9660  
gatgcctctg ggacaatgaa ctctgtgaa ctgaggctgg cactgactgc tgcagggtgtg 9720  
gctgaggacc tgggatgctg tagggacagc aacctatcct caaattcttg tctgcatccc 9780  
tcagctgtgg ccatccctaa taggctgtcc acaagtgcc gagcccatct ccttccctgg 9840  
aggctctgac tgcttatctg tggcatggct aatgtgtagt atggcaagga gccacaaga 9900  
tgccacagaa caccacagat accctaaagc accttatgag gctacggagt tatacaacag 9960  
aggatgaaaa tcccatccta agccatggag aaatgtatgt taggggtggga ttatcgtgat 10020  
ttcagaagac cgtcagctcc atgcctccat gggttcatct gtgaccacta agtaggagcc 10080  
ggggcaggca ggcagggggc ggcacgtagg ctagtggaga atgagagact acaagtatga 10140  
gacctagaat agtggccaag aacatggaag acaagatccc aaggcagagt ccaagggtggg 10200  
ggccagggtg ctgaactaaa gcagtggaca caggacagag gggaggctcg gaacttactc 10260  
gatcatccat ccattcatcc cagagtgcct ggttgttttg gataggagtc tgataataat 10320  
gtttgcctgg gaattctcag caattctaag aggttgacag agggctcctg ggtcagggaac 10380  
tactgccatc tagccaggtt tcccttcagc cctgggccag catagaccaa tactcagggt 10440  
acatggacat cagagggaca ccgacctgcc tcaggccacc tagctctggg catggtgtgc 10500  
ctggtgttcg tgggggtggg aggggcagca tctgttgaat gagcacacaa aggtacaata 10560  
caaacttgta cagttatctt tgagactgta tggggctcat ggaagctggg agggacaagt 10620  
ccttgggcct tagggcttct agaaatccat tgcattgtga ttctacagca gatgtgacag 10680  
agccaatgtc tagactttag gtgcggcctc agaggaagag tcacacagtg gtaccagtc 10740  
ggggagatag tccgtcaacc tctgaaggcg caatcacaaa gctgcacctg ttggcacctt 10800  
gagaagcagc ctaagcaact taagtgtcac actaacttcc cagagggctg gggttgtagc 10860  
tcaacggaga gagcatttgc ttggcctatg caagggcccc ggggttccac ccccaact 10920  
ccaaaacagc cacaaaaggc ccacatcagt tggagagtgc tctcaagcg tgctggagge 10980  
cctgagttct agatcgagta ccacataaac cacaggctga actcttggca cccgaggagg 11040  
ggcagggggc tcaggagctg gtgacagtcc ttggctatgt aggagttaga ggacagcttc 11100  
tttcaaacag cacacaggaa tgctgcgtag gtaaggaact tttacttgca actccagtgt 11160  
gagggccaga gttcagatcc ccagcaccca cgtgaagggc aagtgatctc ggtgagcctc 11220  
ggcctcagta gagaaaggac tgaggaagac gctcccatg tacgtgtgcc caccaccaac 11280  
actaaaataa gcagcaccac acgtggatag tgtaaacaca ataaacaagg cggcctcctc 11340  
gtaggcttcc acctcaaca ccagctgacc cagtcctca ctagccgcta ccgggacagc 11400  
cggctccgtg tggacttcga gcgcttcgtg ggctgtgcag cccggctcac ctgcatcttc 11460  
cgtgagtact cctggcagge agggtagggg gtgggtgggg gtgcatcagg gctgggtgctg 11520  
cgtactcacc ctggcctctc ccacacagge cactgctgcc aacacctgga tggcggcgag 11580  
ggggctgctc gcctgaccca caaacagggt agctggcccc agggacagtg tggtcttagc 11640  
accatcccag ggcctctgcc tcaagggtat ctttcttttc tcttcagtgg tcggagggtg 11700  
ctacctctc ataggtttga agctgaggga ggtcaccctg ctgcccagact cactgtcaca 11760  
aagggtggtg ctatgtaacc ctggccggcc tcacaagtgc tgggattacg agctggagcc 11820  
atcccaaaca gaactgccac ccttctttt gaagcctctt catgtcagtc cctgcttaga 11880  
gaggggcaca acccccacac aggcactggg ctgggtgggca ctgccagctc cttggggcat 11940  
gaacagagat gcaggagaa gatgacacca gagtccttct taaaaatatt acatgtttta 12000  
ttctcccatc ccagagggg ggtttatcca gaaaccaaga aaataaaaat caatcagaat 12060  
aaactcaagg gggcgagtgg agagaaacc attaacgacc aggcaggcag gccagcagcc 12120  
tgctccacc tcagaaggte ccagagacc tctgccacc gccacgagg gaaaatcagg 12180  
agggactggg gagggcattg aatcagctat gtcttcatta tgagagttag agaggtggca 12240

gagatatgca gctatgatgga tatatatatta tataataaat ccgtaagtta ataaagtaaa 12300  
tagtaattct ctgagggtc ttaagttttt aaagttttct ttttttct aagttttttt 12360  
tttccttttt ttttttttaa atgatttttt tgtttgtttc tgttccattc tttgtgtttt 12420  
gttggttttg gtccttagaa aatctgagac tcagaggcca ggtgggctgg ggctgattgc 12480  
cccgcagcca ctctgagggc agagaagggc tatggcaggt cctctgctcc tgggaggagc 12540  
cactggaatc tgggtccaggg gagctgggtg ccctctgctg gacttcttag ggcaggcggt 12600  
tcctggacaa ggcacatggg gctttggcct agatgtgaga ggctttgaag gggcctcagg 12660  
ggcagagggg acctgggata ggaagggtat tctggggcac aggagtccgt tgtccccctcc 12720  
aatcggttaa gaaccacag cacagcgtat atatttagca gaccagaaat gctgattgcc 12780  
aagcctcctt cccctacaag actgagaaag agaggcctgc ctagccccctc cctgcctgac 12840  
cccctagaag gaccacaaag agctctttgc atagatacag agtcagggtg ggggcagggc 12900  
tcctcagccc ctccgggagg ccaagggagt ctctgttcag ggtggccaag ggcctcacag 12960  
gtcgtctctc ccatagaggg ctgtggagaa ggactttag tcaagggcgc caggagcagc 13020  
atcaggcccc tggtaggggt ccatgcgggc gatgcagtac tcggcctggt cggggggcag 13080  
ctctctccgc agttcctcaa cagtgatgaa gttcta 13116

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Capn12-Primer

<400> 9

gaatggcgag tggcaacagg aag

23

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Capn12-Primer

<400> 10

tggggctcag cacaaaactc at

22

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Capn12-Primer

&lt;400&gt; 11

ttcaagactt tctcacg

17

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Capn12-Primer

&lt;400&gt; 12

tcgccccctt gagtttatcc tga

23

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Hprr-Primer

&lt;400&gt; 13

atgccgaccc gcagtcccag cg

22

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Hprr-Primer

&lt;400&gt; 14

ggctttgtat ttggcttttc c

21

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Capn12-Primer

<400> 15

gggagggcca ggacaaggac t

21

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Capn12-Primer

<400> 16

aggggaaggct ggaacaatgg agaa

24

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Capn12-Primer

<400> 17

gaatggcgag tggcaacagg aag

23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Capn12-Primer

<400> 18

ctggggctca gcacaaaact cat

23



<210> 19  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Capn5-Primer

<400> 19  
cggtgacact ggactgggcc ttgc

24

<210> 20  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Capn5-Primer

<400> 20  
aagccgcctg cagagcactg tgg

23

<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Capn5-Primer

<400> 21  
cgaggagtgga acgggcccct g

21

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Capn5-Primer

<400> 22  
ctcactttct gccattcctc

20

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
10. Januar 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/002775 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/52,  
9/64, C12Q 1/68, C07K 16/40, A61K 38/43, G01N 33/68,  
33/577

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07457

(22) Internationales Anmeldedatum:  
29. Juni 2001 (29.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 31 932.7 30. Juni 2000 (30.06.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **BASF AKTIENGESellschaft** [DE/DE];  
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BOEHM, Thomas**  
[DE/DE]; Freiburgerstrasse 30, 79279 Vörstetten (DE).  
**DEAR, Neil, T.** [AU/DE]; Komturstasse 17, 79106  
Freiburg (DE).

(74) Anwälte: **KINZEBACH, Werner** usw.; Reitstötter,  
Kinzebach & Partner, Sternwartstrasse 4, 81679 München  
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 12. Dezember 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CALPAIN PROTEASE 12

(54) Bezeichnung: CALPAIN-PROTEASE 12

(57) Abstract: The invention relates to calpain protease 12 (Capn12), which is characterized in that it has an amino acid sequence comprising amino acids 1 - 342 of SEQ ID NO: 1 or an amino acid sequence selected amongst SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4. The invention also relates to the functional analogs of said calpain protease 12, to the nucleic acids coding therefor, to recombinant vectors containing said coding sequences and to microorganisms transfected therewith. The invention further relates to a method for recombinant production of Capn12 and to different applications of Capn12 and the nucleic acids coding therefor.

(57) Zusammenfassung: Calpain-Protease 12 (Capn12), dadurch gekennzeichnet, daß die eine Aminosäuresequenz, umfassend die Aminosäuren 1 - 342 der SEQ ID NO: 1 oder eine Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 aufweist; sowie deren funktionale Analoge; dafür kodierende Nukleinsäuren; rekombinante Vektoren, welche diese kodierenden Sequenzen enthalten; damit transfizierte Mikroorganismen; Verfahren zur rekombinanten Herstellung der Capn12; und verschiedene Anwendungen der Capn12 und dafür kodierender Nukleinsäuren.

WO 02/002775 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/07457

A. CLASSIFICATION SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/5 C12N9/64 C12Q1/68 C07K16/00 A61K38/43  
G01N33/68 G01N51/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DEAR T NEIL ET AL: "Gene structure, chromosomal localization, and expression pattern of Capn12, a new member of the calpain large subunit gene family." GENOMICS, Bd. 68, Nr. 2, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 152-160, XP002210215 ISSN: 0888-7543 Reference to EMBL/GenBank Data Libraries under Accession Nos. AJ289241, AJ289242, and AJ289243 (=identical with present application). --- -/--	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 August 2002

Date of mailing of the international search report

26.08.2002

Name and mailing address of the ISA/

Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Facsimile No.

Authorized officer

Schmitz, T.

Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DEAR N ET AL: "A NEW SUBFAMILY OF VERTEBRATE CALPAINS LACKING A CALMODULIN-LIKE DOMAIN: IMPLICATIONS FOR CALPAIN REGULATION AND EVOLUTION" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, Bd. 45, Nr. 1, 1. Oktober 1997 (1997-10-01), pages 175-184, XP002061846 ISSN: 0888-7543 Reference to EMBL Y10139, Y10552, Y10665 and Y21583 (see also SWALL 008529).</p>	1-5,7-17
X	<p>--- DATABASE EMBL [Online] 28. Juni 2000 (2000-06-28) ARAKAWA, T. ET AL.: "Mus musculus 6 days neonate skin cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A030006J06, 3' end partial sequence." retrieved from EBI Database accession no. BB150524 XP002210216 abstract</p>	5,8,9
E	<p>--- WO 01 83782 A (PLOWMAN GREGORY D ;PAYNE VILIA (US); SUGEN INC (US); WHYTE DAVID ()) 8. November 2001 (2001-11-08) SEQ ID NO:10+45</p>	1-17
A	<p>--- DATABASE SWALL [Online] 1. November 1997 (1997-11-01) DEAR N. ET AL.: "(Calcium-activated neutral proteinase) (CANP) (M-type) (M-calpain) (Millimolar-calpain) (80 kDa M-calpain subunit) (CALP80)." retrieved from EBI Database accession no. 008529 XP002210217 abstract</p>	
A	<p>--- SAIDO T C ET AL: "CALPAIN: NEW PERSPECTIVES IN MOLECULAR DIVERSITY AND PHYSIOLOGICAL-PATHOLOGICAL INVOLVEMENT" FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, Bd. 8, Nr. 11, 1994, Seiten 814-820,822, XP002010555 ISSN: 0892-6638 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/07457

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DEAR T NEIL ET AL: "CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, Bd. 59, Nr. 2, 15. Juli 1999 (1999-07-15), Seiten 243-247, XP002159274 ISSN: 0888-7543 the whole document -----</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/07457.

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although Claims 16 and 17 relate to a diagnostic method practiced on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of 1.2

Claim: 16 (partially)

The current Claim 16 relates to an extremely large number of possible Capn12-binding molecules, of which only a small portion are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claim is so lacking in proper support, and the application in the requisite disclosure, that it appears impossible to carry out a reasonable search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claim that appear to be supported and disclosed in the sense indicated above, namely the parts relating to Capn12-binding antibodies (page 12, last paragraph).

The applicant should note that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of internal preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also includes cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

CT/EP 01/07457

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/52 C12N9/64 C12Q1/68 C07K16/40 A61K38/43  
G01N33/68 G01N33/577

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q C07K A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>DEAR T NEIL ET AL: "Gene structure, chromosomal localization, and expression pattern of Capn12, a new member of the calpain large subunit gene family." GENOMICS, Bd. 68, Nr. 2, 1. September 2000 (2000-09-01), Seiten 152-160, XP002210215 ISSN: 0888-7543 Reference to EMBL/GenBank Data Libraries under Accession Nos. AJ289241, AJ289242, and AJ289243 (=identical with present application).</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. August 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26. 08. 2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040; Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schmitz, T

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int nales Aktenzeichen  
PCT/EP 01/07457

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DEAR N ET AL: "A NEW SUBFAMILY OF VERTEBRATE CALPAINS LACKING A CALMODULIN-LIKE DOMAIN: IMPLICATIONS FOR CALPAIN REGULATION AND EVOLUTION" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, Bd. 45, Nr. 1, 1. Oktober 1997 (1997-10-01), Seiten 175-184, XP002061846 ISSN: 0888-7543 Reference to EMBL Y10139, Y10552, Y10665 and Y21583 (see also SWALL 008529).</p>	1-5,7-17
X	<p>--- DATABASE EMBL [Online] 28. Juni 2000 (2000-06-28) ARAKAWA, T. ET AL.: "Mus musculus 6 days neonate skin cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A030006J06, 3' end partial sequence." retrieved from EBI Database accession no. BB150524 XP002210216 Zusammenfassung</p>	5,8,9
E	<p>--- WO 01 83782 A (PLOWMAN GREGORY D ;PAYNE VILIA (US); SUGEN INC (US); WHYTE DAVID ()) 8. November 2001 (2001-11-08) SEQ ID NO:10+45</p>	1-17
A	<p>--- DATABASE SWALL [Online] 1. November 1997 (1997-11-01) DEAR N. ET AL.: "(Calcium-activated neutral proteinase) (CANP) (M-type) (M-calpain) (Millimolar-calpain) (80 kDa M-calpain subunit) (CALP80)." retrieved from EBI Database accession no. 008529 XP002210217 Zusammenfassung</p>	
A	<p>--- SAIDO T C ET AL: "CALPAIN: NEW PERSPECTIVES IN MOLECULAR DIVERSITY AND PHYSIOLOGICAL-PATHOLOGICAL INVOLVEMENT" FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, Bd. 8, Nr. 11, 1994, Seiten 814-820,822, XP002010555 ISSN: 0892-6638 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In: ales Aktenzeichen  
T/EP 01/07457

C.(Fortsetzung) ALS WESSENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DEAR T NEIL ET AL: "CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US; Bd. 59, Nr. 2, 15. Juli 1999 (1999-07-15), Seiten 243-247, XP002159274 ISSN: 0888-7543 das ganze Dokument -----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 01/07457

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Obwohl die Ansprüche 16 und 17 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.  
16 (partially)
2. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 16 (partially)

Der geltende Patentanspruch 16 bezieht sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Capn12-bindender Moleküle, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt dem Patentanspruch die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile des Patentanspruchs gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die sich auf Capn12-bindende Antikörper beziehen (Seite 12, letzter Absatz).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 01/07457

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0183782 A	08-11-2001	AU WO 5947301 A 0183782 A2	12-11-2001 08-11-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**